

**Einfluss eines neuartigen aromatischen
Kohlenwasserstoff-Amphiphils
auf Tumorgenese und Metastasierung des
Osteosarkoms im murinen Modell**

von

Laura Anna Vera Heimann

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Einfluss eines neuartigen aromatischen
Kohlenwasserstoff-Amphiphils
auf Tumorgenese und Metastasierung des
Osteosarkoms im murinen Modell**

von

Laura Anna Vera Heimann

aus Ahlen in Westfalen

München 2019

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Chirurgie der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Angefertigt in der

Experimentellen Unfallchirurgie

Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie

Klinikum rechts der Isar

Technische Universität München

Mentor: Prof. Dr. Martijn van Griensven

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Tag der Promotion: 27. Juli 2019

**Gewidmet
meiner Familie
&
Angela**

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Definition eines Osteosarkoms allgemein	3
2.	Das kanine Osteosarkom	3
2.1.	Epidemiologie	3
2.2.	Formen	5
2.2.1.	Appendikuläres Osteosarkom	5
2.2.2.	Osteosarkome des axialen Skeletts	5
2.2.2.1.	Osteosarkome des Schädels	5
2.2.2.2.	Osteosarkome der Wirbel	7
2.2.2.3.	Osteosarkome der Rippen	7
2.2.2.4.	Osteosarkome des Beckens und der Skapula	8
2.2.2.5.	Multilobuläre Osteochondrosarkome (MLO)	8
2.2.2.6.	Juxtakortikale Osteosarkome	9
2.2.2.7.	Extraskelettale Osteosarkome	9
2.3.	Ätiologie des appendikulären Osteosarkoms	10
2.4.	Genetik des appendikulären Osteosarkoms	11
2.5.	Biologisches Verhalten des appendikulären Osteosarkoms	12
2.6.	Klinik des appendikulären Osteosarkoms	13
2.7.	Diagnostik des appendikulären Osteosarkoms	14
2.8.	Differentialdiagnosen des appendikulären Osteosarkoms	16
2.9.	Staging des appendikulären Osteosarkoms	16
2.10.	Therapie des appendikulären Osteosarkoms	18
2.10.1.	Amputation	18
2.10.2.	Gliedmaßenerhaltende Chirurgie	19
2.10.3.	Chemotherapie	22
2.10.3.1.	Systemische Chemotherapie	22
2.10.3.2.	Lokale und lokoregionale Chemotherapie	23
2.10.4.	Strahlentherapie	24
2.10.5.	Chirurgische Metastasenresektion	25

2.11.	Übersicht über Überlebenszeiten verschiedener Therapieformen	26
2.12.	Prognose und Outcome des appendikulären Osteosarkoms	28
2.13.	Alternative und innovative Therapiekonzepte bei Mensch und Hund	32
2.13.1.	Immuntherapie	32
2.13.2.	Matrix-Metalloproteinasen-(MMP)-Inhibitoren	32
2.13.3.	Aminobisphosphonate	33
2.13.4.	Tetrathiomolybdat (TM).....	33
2.13.5.	Aerosoltherapie.....	34
2.13.6.	Nanopartikeltherapie	34
2.13.7.	Meloxicam und Piroxicam	35
3.	Vergleich des kaninen und humanen Osteosarkoms	36
3.1.	Epidemiologie.....	36
3.2.	Ätiologie	37
3.3.	Genetik	37
3.4.	Biologisches Verhalten	38
3.5.	Klinik	38
3.6.	Diagnostik.....	39
3.7.	Therapie	39
3.8.	Prognose und Outcome	40
3.9.	Fazit und Bedeutung für die Osteosarkom-Forschung	43
4.	<i>In vivo</i>-Osteosarkom-Forschung	45
4.1.	Anfänge der <i>in vivo</i> -Osteosarkom-Forschung.....	45
4.1.	Eigenschaften eines Osteosarkom-Modells.....	45
4.2.	Entwicklung und Geschichte der murinen K7M2-Zelllinie.....	47
4.3.	Eigenschaften der K7M2-Zelllinie	47
4.4.	Neue Entwicklungen und Ausblick	48
5.	Das aromatische Kohlenwasserstoff-Amphiphil (N-(fluorenylmethoxycarbonyl)-glucosamin-6-phosphat)	50
5.1.	Allgemeine Eigenschaften des aromatischen Kohlenwasserstoff-Amphiphils.....	50
5.2.	Funktionsprinzip des aromatischen Kohlenwasserstoff-Amphiphils.....	50
5.3.	Alkalische Phosphatase	52

6.	Der Metabolit Sauerstoff und seine Rolle im neoplastischen	
	Zusammenhang	55
6.1.	Bedeutung von Sauerstoff für Neoplasien	55
6.1.1.	HIF-1-Signalweg	57
6.2.	Einfluss der Tumorhypoxie auf Chemo- und Strahlentherapieeffizienz ...	59
III.	MATERIAL UND METHODEN	61
1.	Material	61
1.1.	Geräte	61
1.2.	Verbrauchsmaterialien	62
1.3.	Puffer/Lösungen/Medium	64
1.4.	Färbelösungen Mikroskopie und Histologie	66
2.	Methoden	67
2.1.	<i>In vitro</i> -Versuch	67
2.1.1.	Verwendete Osteosarkomzellen und Kultur	67
2.1.2.	Versuchsaufbau	69
2.1.3.	Zubereitung der aKA-Lösungen in verschiedenen Konzentrationen	69
2.1.4.	MTT-Assay	69
2.1.5.	DNA-Quantifizierungs-Assay PicoGreen	70
2.1.6.	Mikroskopie	70
2.1.7.	VisiSens TD-System	71
2.1.8.	Statistik	72
2.2.	<i>In vivo</i> -Versuch	73
2.2.1.	Versuchsziele	73
2.2.2.	Versuchstiere	73
2.2.3.	Versuchstierhaltung	74
2.2.4.	Versuchsgruppen	75
2.2.5.	Versuchsablauf	76
2.2.6.	Tumorzellimplantation	76
2.2.7.	Tumorgenese bis Tag 20	79
2.2.8.	µCT-Tumormarkierung und –scan	79
2.2.9.	Behandlung mittels aKA/Vehikel	80
2.2.10.	Verlaufskontrolle mittels µCT, Blutentnahme (BE)	80

2.2.11.	Sauerstoffmessungen intratibial	81
2.2.12.	Versuchssende	82
2.2.13.	μCT-Analyse.....	82
2.2.14.	Luminex MagPix	85
2.2.15.	Histologie.....	87
2.2.15.1.	Hämalaun-Eosin-Färbung (H.-E.-Färbung)	87
2.2.15.2.	Masson-Goldner-Trichrom-Färbung	88
2.2.15.3.	Perjodsäure-Schiffs (PAS) – Färbung.....	89
2.2.15.4.	Einscannen der histologischen Schnitte.....	89
2.2.16.	Statistik.....	89
IV.	ERGEBNISSE	91
1.	<i>In vitro</i>-Versuch.....	91
1.1.	MTT-Assay	91
1.2.	DNA-Quantifizierungs-Assay PicoGreen	93
1.3.	Mikroskopie.....	93
1.4.	Sauerstoffmessungen mit VisiSens	94
1.5.	Fazit	95
2.	<i>In vivo</i>-Versuch	96
2.1.	Allgemeiner Versuchsablauf	96
2.1.1.	Zustand Mäuse	96
2.1.2.	Gewichtsentwicklung	96
2.1.3.	Fazit	99
2.1.	μCT-Bildgebung und -Analyse	99
2.1.1.	Gesamtgewebenvolumen (TV).....	103
2.1.2.	Totales Knochenvolumen (BV)	105
2.1.3.	Verhältnis Knochenvolumen zu Gesamtgewebenvolumen (BV/TV %).....	107
2.1.4.	Knochenmineraldichte (BMD).....	109
2.1.5.	Fazit	111
2.2.	Sauerstoffmessungen intratibial	112
2.2.1.	Fazit	112
2.3.	Luminex MagPix	113
2.3.1.	Fazit	115

2.4.	Histologie.....	115
2.4.1.	Knochenhistologie.....	115
2.4.2.	Lungenhistologie	119
2.4.3.	Fazit	123
V.	DISKUSSION	125
1.	Beurteilung des präklinischen Tiermodells.....	126
2.	Osteosarkom-Zelllinie K7M2	130
2.1.	<i>In vitro</i>	131
2.2.	<i>In vivo</i>	131
3.	Eignung des aromatischen Kohlenwasserstoffamphiphils (aKA) und Vergleich mit ähnlichen Therapieansätzen.....	132
4.	Diskussion der <i>in vivo</i>-Ergebnisse	136
5.	Abschließende Beurteilung und Ausblick	139
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	141
VII.	SUMMARY	143
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	145
IX.	ANHANG	189
1.	Abbildungsverzeichnis.....	189
2.	Copyright-Bescheinigungen verwendeter Abbildungen	193
3.	Tabellenverzeichnis.....	197
4.	Scoresheet	198
5.	Aufzeichnungsmuster Kohlenwasserstoff-Amphiphile zur Irradikation von Osteosarkomen (Az.: 55.2-1-54-2532-142-2016).....	201
X.	DANKSAGUNG	203

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μl	Mikroliter	IGF-1	Insulin-like growth factor 1
μm	Mikrometer	ILP	Isolated limb perfusion
AC	Attenuation coefficient	i.p.	intraperitoneal
aKA	Aromatisches Kohlenwasserstoff-amphiphil	kg	Kilogramm
ALP	Alkalische Phosphatase	KG	Körpergewicht
ATP	Adenosintriphosphat	L-MTP-PE	L-Muramyltripectid-Phosphatidylethanolamin
BALP	Bone alkaline phosphatase	Lnn.	Lymphonodi
Bzw.	Beziehungsweise	M. latissimus dorsi	Musculus latissimus dorsi
CA-9	Carboanhydrase 9	mg	Milligramm
COL	Pro-1-Collagen	mm	Millimeter
COX-2	Cyclooxygenase 2	mM	Millimolar
CT	Computertomographie	ml	Milliliter
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser	MGP	Matrix Gla Protein
DFI	Disease free interval	MLO	Multilobuläre Osteochondrosarkome
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	MMP	Matrixmetalloproteinasen
DMSO	Dimethylsulfoxid	MRT	Magnetresonanztomographie
DNA	Desoxyribonucleic acid	MÜZ	Mediane Überlebenszeit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	NaCl	Natriumchlorid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	NaOH	Natriumhydroxid
FBJ-Virus	Finkel-Biskis-Jinkins-Virus	NMRI-nu	Naval Medical Research Institute-nude Maus
FCS	Fetal calf serum	OCN	Osteocalcin
FELASA	Federation for laboratory animal science association	OPLA-Pt	Open cell polylactic acid-Platin
27 G	27 Gauge	OPN	Osteopontin
GLUT	Glukosetransporter	OS	Osteosarkom
HA	Hydroxyapatit	P-gp	P-Glykoprotein
Helicobacter spp.	Helicobacter species pluralis	P/S	Penicillin-Streptomycin
HER	Human epidermal growth factor receptor	PBS	Phosphate-buffered saline
HGF	Hepatocyte growth factor	PDGF-β	Platelet derived growth factor β
HIF	Hypoxia-inducible factor	PET-CT	Positronenemissions-Computertomographie

PMMA	Polymethylmethacrylat
PTEN	Phosphatase und Tensinhomolog
s.c.	subcutaneous
SALP	Serum alkaline phosphatase
SDH	Succinatdehydrogenase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SRB	Sulforhodamin-B
SPF	Spezifiziert pathogenfrei
TALP	Total alkaline phosphatase
TM	Tetrathiomolybdat
ÜZ	Überlebenszeit
V. facialis	Vena facialis
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZPF	Zentrum für präklinische Forschung

I. EINLEITUNG

„Ich bin noch nicht bereit sie gehen zu lassen. Und auch sie selbst ist noch nicht bereit zu gehen. Das Leben hatte doch gerade erst angefangen.“

(Zitat einer Hinterbliebenen, deren Schwester mit 19 Jahren einer Osteosarkomerkrankung erlag)

Bis heute sind solche Schicksale im Zusammenhang mit einer Osteosarkomerkrankung kein Einzelfall und stellen behandelnde Humanmediziner vor große Herausforderungen. Charakteristisch für diesen Tumor ist ein äußerst progressiver und aggressiver Verlauf mit sehr hohem Metastasierungspotential, welcher ein ebenso aggressives und interdisziplinäres Therapiekonzept erfordert (Schlegel, 2017). Relativ gesehen gelten diese malignen Knochentumore als selten, dennoch sind zwei bis fünf Patienten pro 100.000 Einwohner vorallem im Kindes- und Jugendalter betroffen (Bianchi et al., 2004). Mit Beginn der multimodalen Chemotherapie in den 1970ern konnte bereits eine deutliche Verbesserung der Therapieergebnisse erzielt werden (Kotz et al., 2002), jedoch stagnieren die 5-Jahres-Überlebensraten seitdem im Bereich von 60-80% (Gebert et al., 2002). Patienten mit bereits metastasiertem Osteosarkom haben eine wesentlich geringere Überlebenschance von ca. 20 % (Harris et al., 1998; Bielack et al., 2002).

Auch die kanine Spezies ist vom Osteosarkom betroffen, hier stellt es sogar den häufigsten aller kaninen malignen Knochentumoren dar (Liptak et al., 2004b; Morello et al., 2011). Das kanine Osteosarkom zeichnet sich durch eine noch höhere Malignität im Vergleich zum humanen Äquivalent aus und metastasiert ebenfalls sehr früh (Gorman et al., 2006; Morello et al., 2011). Leider stagnieren daher auch in der Veterinärmedizin die Überlebensraten seit Jahren in einem unzufriedenstellenden Bereich (je nach Therapie überleben 2 Jahre nach Diagnosestellung nur 20-30%) (Berg, 1996; Hahn et al., 1997). Aufgrund ähnlicher Lebensbedingungen und vieler Gemeinsamkeiten im Krankheitsverlauf (z.B. Metaphysenlokalisierung und Metastasierung) bei humaner und kaniner Spezies, rückt der Hund in Forschungsbelangen immer mehr in den Fokus der Wissenschaftler. Ein Umstand, der auch die kanine Therapie weiter verbessern

könnte. Es herrscht somit in der Human- und Tiermedizin großes Interesse und Bedarf an weiterführender Forschung sowie innovativen Therapiekonzepten, um die Überlebenswahrscheinlichkeit bei Mensch und Hund zu steigern. Da die *in vivo*-Forschung meist in einem Nagermodell begonnen wird, fiel die Wahl im Rahmen dieses Projekts auf die Maus.

In dieser Arbeit wird untersucht, ob und inwiefern ein neuartiges aromatisches Kohlenwasserstoffamphiphil als möglicher neuer Therapieansatz Einfluss auf Tumorgenese, -progression und Metastasierung des Osteosarkoms im murinen Modell nimmt.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Definition eines Osteosarkoms allgemein

Das Osteosarkom ist ein primär maligner Knochentumor mesenchymalen Ursprungs mit hohem Malignitätsgrad (Tabelle 1). Charakteristisch für diese Neoplasie sind Knochenmatrix (=Osteoid) und/oder unreifes trabekuläres Knochengewebe-bildende spindelförmige pluripotente Mesenchymzellen (Bianchi et al., 2004; Kessler und Ammer, 2013; Imbach et al., 2014).

Tabelle 1: Pathologische Systematik von Tumoren aus (Hermanns, 2015)

	gutartig	bösartig
epitheliale Tumoren	Zellart + -om (Epitheliom, Fibrom)	-karzinom (Plattenepithelkarzinom)
mesenchymale Tumoren		-sarkom (Fibrosarkom)

2. Das kanine Osteosarkom

2.1. Epidemiologie

Mit einer Inzidenz von 5,5-6,5 Erkrankungen pro 100.000 Hunden (Priester und McKay, 1980; Dernell et al., 2001) und einem Anteil von 5-6 % an allen bösartigen kaninen Tumoren (Brodey et al., 1963; Brodey und Riser, 1969; Priester und McKay, 1980; Jongeward, 1985) ist das Osteosarkom absolut gesehen eine seltene Tumorerkrankung. Relativ gesehen sind Osteosarkome mit 85-90 % jedoch die häufigsten primären Knochentumore (Kessler und Ammer, 2013).

75 % der Tumore treten appendikulär auf, betreffen also das Gliedmaßenskelett, während die restlichen 25 % axial an den platten und kurzen Knochen auftreten (Wolke und Nielsen, 1966; Gorman et al., 2006; Withrow et al., 2013). Die Größe der Hunde spielt dabei eine entscheidende Rolle: 95 % aller großwüchsigen Hunde entwickeln appendikuläre Osteosarkome und nur 5 % die axiale Form (Withrow et

al., 2013). Bei eher kleinwüchsigen Patienten (unter 15 kg) ist zu 60 % das axiale Skelett betroffen (Brodey und Riser, 1969; Kistler, 1981; Cooley und Waters, 1997).

Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung beträgt 7-9 Jahre, es existieren jedoch auch Erkrankungsberichte über wesentlich jüngere Hunde, die zum Diagnosezeitpunkt erst 10 bzw. 18-24 Monate alt waren (Misdorp und Hart, 1979) (Evans, 1983; Withrow et al., 2013). Der jüngste in der Literatur beschriebene Fall war ein erst 6 Monate alter Welpen (Phillips et al., 1986).

Bestimmte Rassen scheinen prädisponiert für eine Osteosarkomerkrankung zu sein. Darunter fallen in Deutschland Rottweiler, Deutscher Schäferhund, Dogge, Boxer und Bernhardiner (Kessler und Ammer, 2013). Jüngere Studien berichten zusätzlich von Greyhounds und Retrievern. Ausschlaggebend scheint im Gesamtkontext aber weniger die Rasse, als viel mehr Größe, Gewicht und die damit verbundenen Belastungen für entsprechende Skelettareale zu sein (Kistler, 1981; Rosenberger et al., 2007). 75 % der Osteosarkome großer Rassen finden sich metaphysär an den langen Röhrenknochen, dabei sind am häufigsten distaler Radius und proximaler Humerus betroffen (Knecht und Priester, 1978; Withrow et al., 2013). Ebenfalls oft betroffene Lokalisationen sind proximale und distale Anteile der Tibia (Withrow et al., 2013). Interessanterweise ist bei Greyhounds vermehrt der proximale Femur in der Literatur genannt (Rosenberger et al., 2007).

Hinsichtlich der Geschlechterverteilung scheinen Rüden mit einem Geschlechtsverhältnis von 1,5:1 bisher häufiger zu erkranken (Misdorp und Hart, 1979; Kistler, 1981; Spodnick et al., 1992; Egenvall et al., 2007). Jüngere Studien bestätigen dies jedoch nicht und berichten von ähnlichen Inzidenzen (weiblich 46.9 % : männlich 53.1 %) (Belanger et al., 2017). Kastrierte Hunde beider Geschlechter haben ein signifikant höheres Risiko an einem Osteosarkom zu erkranken als intakte Hunde (Ru et al., 1998; Cooley et al., 2002; Kustritz, 2007; Kustritz, 2012; de la Riva et al., 2013; Hart et al., 2014; Smith, 2014; Belanger et al., 2017). Dabei ist die genaue Ätiologie dieses erhöhten Risikos nicht bekannt, es wird jedoch der nachfolgend beschriebene Zusammenhang vermutet. Nach Gonadektomie und entsprechendem Abfall der Sexualhormonlevel kommt es häufig zur Entwicklung einer Adipositas. Als Folge dieser Adipositas entwickeln sich

nahezu regelmäßig Gelenkerkrankungen und die Inzidenz neoplastischer Erkrankungen steigt (German, 2006; Lund et al., 2006). Somit könnte die erhöhte Inzidenz eines Osteosarkoms ein sekundärer Effekt sein, basierend auf erhöhtem Körpergewicht und gesteigertem Metabolismus (McGreevy et al., 2005; Colliard et al., 2006).

2.2. Formen

2.2.1. Appendikuläres Osteosarkom

75 % aller Osteosarkome betreffen das Gliedmaßenskelett (Wolke und Nielsen, 1966). Diese Form wird in Kapitel 2.3 bis 2.11 ausführlich behandelt.

2.2.2. Osteosarkome des axialen Skeletts

Bei Osteosarkomen des axialen Skeletts sind die platten und kurzen Knochen betroffen. Sie kommen dabei insgesamt eher selten vor, der Anteil bei kleinen Hunden unter 15 kg liegt allerdings bei über 40 % (Brodey und Riser, 1969; Kistler, 1981; Heyman et al., 1992; Hammer et al., 1995; Cooley und Waters, 1997). Vor allem kleine Terrier-Rassen, Spaniel und Dackel scheinen hier anfällig zu sein (Kessler und Ammer, 2013). Eine weitere Studie berichtet von hauptsächlich mittelgroßen und großen betroffenen Hunderassen. Prädisloktionsstellen für diese Art von Osteosarkomen sind in absteigender Reihenfolge Schädel (Mandibula, Maxilla, restliche Schädelanteile), Wirbel, Rippen und Becken (Heyman et al., 1992). Seltener ist die Skapula betroffen (Kirpenstein et al., 1994). Betroffene Hunde sind im Durchschnitt etwa 9 Jahre alt, eine Ausnahme stellen hier Osteosarkome der Rippen dar (Heyman et al., 1992; Cooley und Waters, 1997). Weibliche Hunde erkranken häufiger an einem Osteosarkom der Maxilla und des Beckens als Rüden (Heyman et al., 1992).

2.2.2.1. Osteosarkome des Schädels

Zumeist ist bei Osteosarkomen des Schädels die Mandibula betroffen, gefolgt von Maxilla und den restlichen Schädelanteilen (Heyman et al., 1992). Die Tumoren dieser Lokalisierung weisen niedrige Mitoseraten auf (Loukopoulos und Robinson, 2007). 15 % der mandibulären kaninen Osteosarkome waren in einer Studie bei Hunden mit einem Gewicht unter 15 kg zu finden und zwei Drittel der Patienten

gehörten dem weiblichen Geschlecht an (Straw et al., 1996).

Palpatorisch sind Osteosarkome der Kieferknochen durch knochenharte Raumforderungen charakterisiert, die in späteren Stadien Probleme bei der Nahrungsaufnahme bereiten können. Symptome maxillärer Osteosarkome reichen von Deformation des Viszerokraniums, Exophthalmus, Schmerzen und Dysphagie bis hin zu Nasenausfluss (Kessler und Ammer, 2013). Die Metastasierung erfolgt bei mandibulären Osteosarkomen pulmonal, osseär, viszeral und in Lymphknoten, allerdings relativ spät und nur bei 5-30 % der Patienten (Heyman et al., 1992; Straw et al., 1996). Eine späte Metastasierung trifft auch auf maxilläre Osteosarkome zu (Heyman et al., 1992).

Therapie der Wahl bei Osteosarkomen der Kiefer stellt die Maxill-/Mandibulektomie dar. Dabei hat die vollständige Resektion eines Osteosarkoms der Mandibula die beste Prognose aller Lokalisationen dieses Tumors beim Hund. Ein Jahr nach Mandibulektomie leben noch 70 % der kaninen Patienten (Straw et al., 1996). Systemische Chemotherapie und primäre Strahlentherapie haben bisher keine lebensverlängernde Effekte gezeigt (Heyman et al., 1992; Straw et al., 1996; Kessler und Ammer, 2013).

Die Maxillektomie stellt eine weitaus größere Herausforderung für den Chirurgen dar, eine Kombination aus dorsolateralem und intraoralem Zugang sowie präoperativer Computertomographie zur Planung ist dabei aber hilfreich (Lascelles et al., 2003). Eine Studie berichtet von 1-Jahres-Überlebenszeiten von 45 % (White, 1991).

Osteosarkome der Schädeldeckenknochen kommen überproportional oft bei Boxern vor (Hardy et al., 1967; Brodey und Riser, 1969). Sie machen sich als knochenharte Schädelauftreibung bemerkbar und können mit zentralnervösen Ausfallerscheinungen, Kauproblemen und Exophthalmus, sowie inspiratorischem Atemgeräusch und Nasenausfluss einhergehen (Hardy et al., 1967; Kessler und Ammer, 2013). Etwa 30 % entwickeln Metastasen (Hardy et al., 1967). Histologisch sind Schädelosteosarkome häufig niedrigeren Grades (Loukopoulos und Robinson, 2007), die Prognose ist jedoch trotzdem als vorsichtig aufgrund der schlechten Voraussetzungen für eine vollständige chirurgische Resektion zu beurteilen

(Kessler und Ammer, 2013).

2.2.2.2. Osteosarkome der Wirbel

Mit 46 % ist das Osteosarkom der häufigste aller kaninen Wirbeltumoren (Slatter, 2003). Das durchschnittliche Erkrankungsalter beträgt 7 Jahre (Morgan et al., 1980). Symptomatisch kommt es zu schnell auftretenden neurologischen Problemen wie Hyperästhesien und lokalem Schmerzempfinden. Die Therapieempfehlung besteht in einer (Hemi-)Laminektomie mit dem Ziel der Myelondekompression und der Biopsieentnahme in Ermangelung einer Möglichkeit zur vollständigen Resektion (Dernell et al., 2001). Additiv besteht die Möglichkeit einer palliativen Radiotherapie, dennoch ist die Prognose als vorsichtig bis infaust zu beurteilen (Dickerson et al., 2001).

2.2.2.3. Osteosarkome der Rippen

64 % der primären malignen Rippentumoren sind Osteosarkome (Pirkey-Ehrhart et al., 1995; Liptak et al., 2004a). Betroffen sind zumeist mittelgroße und große Hunde (Pirkey-Ehrhart et al., 1995) im Alter von 4,5 - 5,5 Jahren (Feeney et al., 1982; Heyman et al., 1992). Palpatorisch sind die Rippenosteosarkome als harte und unverschiebbliche Raumforderung am Thorax charakterisiert. Sie sind schmerzhaft und zum Zeitpunkt der Diagnosestellung meist bereits im fortgeschrittenen Stadium. Respiratorische Einschränkungen werden nicht beobachtet, es kann aber zum Thoraxerguss kommen (Kessler und Ammer, 2013). Die Tumorbiologie zeichnet sich durch eine hohe Aggressivität, eine hohe Mitoserate und häufige Metastasierung aus (Feeney et al., 1982; Hammer et al., 1995; Loukopoulos und Robinson, 2007). Therapeutisch wird die en-bloc-Resektion der tumorös veränderten und benachbarten Rippen empfohlen, sowie im Anschluss eine Chemotherapie (Matthiesen et al., 1992; Pirkey-Ehrhart et al., 1995). Zur Defektdeckung erfolgt eine autologe Transplantation in Kombination mit einer M.-latissimus-dorsi-Muskellappenplastik (Halfacree et al., 2007; Liptak et al., 2008). Ansonsten eignen sich resorbierbare Prolenenetze oder Plastikplatten um die Thoraxwand zu substituieren, jedoch ist hier die Komplikationsrate höher (Bright, 1981; Matthiesen et al., 1992; Liptak et al., 2008). Hinsichtlich der Prognose hat sich die Kombination aus en-bloc-Resektion

und adjuvanter Chemotherapie gegenüber der alleinigen chirurgischen Therapie bewährt (Matthiesen et al., 1992; Pirkey-Ehrhart et al., 1995).

2.2.2.4. Osteosarkome des Beckens und der Skapula

Diese Lokalisationen sind nur selten von einem Osteosarkom betroffen, die Neoplasie kann sich jedoch bei Erkrankung des Femurkopfes über das Ligamentum proprium auf das Azetabulum ausbreiten und somit auf das Becken übergreifen. Symptomatisch äußert sich zunächst die Erkrankung in einer lokalisierten Umfangsvermehrung und geringgradigen Bewegungseinschränkungen, im späteren Verlauf können durch Nervenschädigungen und Beeinträchtigung des Hüftgelenks stärkere Lahmheiten sowie Defäkationsprobleme auftreten (Kessler und Ammer, 2013). Aus therapeutischer Sicht wird hier zur Hemipelvektomie geraten, die bei entsprechenden chirurgischen Fähigkeiten ein sehr gutes Outcome ermöglicht (Straw et al., 1992b; Kramer et al., 2008). Als Alternative kommt eine palliative Radiotherapie in Betracht (Dickerson et al., 2001).

Die Therapie eines Skapula-Osteosarkoms besteht aus einer Kombination von computertomographischer Planung, Amputation der kompletten Gliedmaße bzw. partieller/totaler Skapulektomie und adjuvanter Chemotherapie (Kirpenstein et al., 1994; Norton et al., 2006). Die hohe Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung macht dieses multimodale Therapieverfahren nötig (Hammer et al., 1995).

2.2.2.5. Multilobuläre Osteochondrosarkome (MLO)

Das seltene maligne MLO geht von den flachen Schädelknochen aus und wird auch als Chondroma rodens oder multilobuläres Osteom/Chondrom bezeichnet (Straw et al., 1989a; Dernell et al., 1998). Betroffen sind ältere Hunde von mittelgroßer bis großer Rasse beider Geschlechter. Die meistens betroffenen Lokalisationen sind das Schädeldach und das Jochbein.

In der diagnostischen Bildgebung zeigt sich klassischerweise eine „gelappte, röntgendichte Masse mit grobkörnigen Verkalkungen und scharf abgegrenzten Rändern zum benachbarten Knochengewebe, das eine begrenzte Lyse aufweisen kann“ (Kessler und Ammer, 2013) zitiert nach (Straw et al., 1989a). Die Histologie ist charakterisiert durch von Spindelzellen umgebenen Inseln von partiell oder total verkalktem Knorpel- oder Knochengewebe (Straw et al., 1989a). Als Folge der

kompressiven Wirkung auf das Gehirn können neurologische Defizite auftreten (Gallegos et al., 2008; Psychas et al., 2009).

Die Tumorbilogie ist charakterisiert durch langsames Wachstum, Lokalinvasivität, späte Metastasierung und häufige Rezidivierung nach marginaler Resektion (Straw et al., 1989a). Die Therapieempfehlung besteht aus sorgfältiger Operationsplanung mit CT und MRT sowie aggressiver Chirurgie (Gallegos et al., 2008). Adjvante Chemo- oder Radiotherapie brachten bisher keine lebensverlängernden Erfolge (Dernell et al., 1998).

2.2.2.6. Juxtakortikale Osteosarkome

Im Unterschied zum häufigsten vorkommenden appendikulären Osteosarkom, das primär innerhalb des Knochens entsteht, sind die sehr seltene juxtakortikale und periosteale Form an der Knochenaußenseite bzw. dem Periost lokalisiert. Diese weniger aggressive Variante des Osteosarkoms lässt sich in der röntgenologischen Bildgebung gut an dem intakten Knochenkortex erkennen. In der Histologie lassen sich Tumorzellen und gut differenzierte Chondro-, Fibrozyten und Osteoblasten unterscheiden. Zu kleine Biopsien können daher als Chondrom, Osteom oder reaktives Knochengewebe fehldiagnostiziert werden (Withrow et al., 2013).

Die Tumorbilogie zeichnet sich durch eine geringere Malignität im Vergleich mit der appendikulären Form, langsames Wachstum und späte Metastasierung aus. Eine En-bloc-Resektion der betroffenen Lokalisation bzw. Amputation oder gliedmaßenerhaltende Chirurgie sind Therapie der Wahl (Withrow, 1980).

2.2.2.7. Extraskelletale Osteosarkome

Die sehr seltenen extraskelletalen Osteosarkome machen etwa 2 % aller Osteosarkomerkrankungen aus und sind im Weichteilgewebe und der Mamma lokalisiert. Betroffene Weichteile sind zu über 80 % viszerale Organe wie Milz, Leber, Niere, Nebennieren, Dünndarm, Hoden, Vagina und Augen (Kuntz et al., 1998a). Betroffen sind vor allem alte Hunde (durchschnittlich 11 Jahre alt) beider Geschlechter der Rassen Beagle und Rottweiler. Das Gewicht scheint ebenfalls Einfluss zu nehmen: Eine Studie berichtet, dass über 40 % der erkrankten Hunde unter 15 kg wogen (Kuntz et al., 1998a; Langenbach et al., 1998). Diese

Osteosarkomform ist charakterisiert durch eine hohe Aggressivität und hohe Metastasierungswahrscheinlichkeit. Von einer monotherapeutischen chirurgischen Therapie ist aufgrund der schlechten Prognose und Überlebenszeiten von 26-33 Tagen abzuraten (Patnaik, 1990; Kuntz et al., 1998a). Die Prognose verbessert sich bei adjuvanter Chemotherapie mit Cisplatin oder Doxorubicin nur marginal (Kuntz et al., 1998a).

2.3. Ätiologie des appendikulären Osteosarkoms

Leider existieren keine gesicherten umfassenden Erkenntnisse zur Ätiologie des Osteosarkoms (Morello et al., 2011).

Bei Betrachtung der am häufigsten betroffenen Skelettanteile fällt auf, dass vor allem Areale in der Nähe von spät schließenden Wachstumsfugen gewichtstragender Knochen erkranken. Aufgrunddessen lag die Vermutung nahe, dass Mikrotraumen und Verletzungen der Wachstumszone ursächlich für eine Osteosarkom-Erkrankung sein könnten (Gellasch et al., 2002). Diese These würde auch die hohe Inzidenz bei Greyhounds stützen, die viel im Rennsport eingesetzt werden und deren Knochen somit starken Belastungen ausgesetzt sind (Salisbury und Lantz, 1988).

Trauma- und frakturassoziierte Osteosarkome im Zusammenhang mit Fremdkörpern, Munitionsteilen, Osteosynthese und Metallimplantaten treten in ca. 5 % der Fälle auf. In diesen Fällen nahmen oftmals Infektionen, lang verbleibende Fremdkörper oder andere heilungsbeeinträchtigende Faktoren Einfluss (Knobloch, 1990; Harasen und Simko, 2008; Dunn et al., 2012). In Anbetracht dieses geringen Vorkommens könnte das Auftreten von Osteosarkomen nach Metallimplantaten aber auch nur ein simpler Zufall sein (Murphy und Parker, 1997). Prädilektionsstelle für diese Osteosarkomform ist der Femur (Stevenson et al., 1982; Stevenson, 1991; Slatter, 2003). Trauma-assoziierte Osteosarkome treten gehäuft diaphysär auf, dies unterscheidet sie von der spontan auftretenden Form (Gillette et al., 1990). Selten kommt es zu einem spontanen oder postoperativen Infarkt des Knochens, hier wird ebenfalls ein Zusammenhang mit dem Osteosarkom vermutet (Marcellin-Little et al., 1999; Holmberg et al., 2004). Osteochondritis dissecans wird ebenfalls als ursächlicher

Faktor für eine Osteosarkomkrankung in der Literatur genannt (Holmberg et al., 2004).

Aufgrund der Erkrankungshäufigkeit bei bestimmten Rassen wie Bernhardinern, Rottweilern und Scottish Deerhound geht man außerdem von einer gewissen hereditären Komponente aus (Phillips et al., 2007; Thomas et al., 2009; Phillips et al., 2010).

Es ist des Weiteren bekannt, dass Strahlung Osteosarkome induzieren kann (Gillette et al., 1990; Dickinson et al., 2001).

2.4. Genetik des appendikulären Osteosarkoms

Mit Fortschritt der molekularbiologischen Möglichkeiten konnten in den letzten Jahren Genmutationen im Zusammenhang mit Osteosarkomkrankungen detektiert werden. Eine erhöhte Expression des p53-Tumorsuppressorgens kommt bei 40,7 % der kaninen Osteosarkomfälle vor und geht mit kürzeren Überlebenszeiten einher (Kirpensteijn et al., 2008). Andere Studien berichten von hochaggressivem Tumorverhalten im Zusammenhang mit einer Überexpression des p53-Gens (Sagartz et al., 1996; Van Leeuwen et al., 1997; Mendoza et al., 1998; Loukopoulos et al., 2003).

Eine Überexpression des erb-B2-Gens, kodierend für den humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (HER-2), wurde in kaninen Zelllinien und Gewebeproben festgestellt (Flint et al., 2004). Eine weitere Studie berichtet von Deletionen, Mutationen und verminderter Expression des PTEN (Phosphatase und Tensinhomolog)-Tumorsuppressionsgens in Osteosarkomzelllinien und –tumorgewebe (Levine et al., 2002). Weiterhin scheinen der Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) und sein Rezeptor c-Met, sowie Insulin-like-growth factor-1 (IGF-1) und sein Rezeptor (IGF-1R) an der Osteosarkomentwicklung beteiligt zu sein (Ferracini et al., 2000; MacEwen et al., 2004; De Maria et al., 2009; Fieten et al., 2009).

Die an der Progression des Primärtumors und der Metastasierung beteiligten Matrixmetalloproteinasen (MMP)-2 und -9 werden ebenfalls in Zelllinien und Tumorgewebe exprimiert (Lana et al., 2000; Loukopoulos et al., 2004). Ebenfalls an der Metastasierung beteiligt ist Ezrin, ein Membran und Zytoskelett

verbindendes Protein. Es konnte in 83 % der kaninen Primärtumore nachgewiesen werden und wird mit kürzeren Remissionszeiten assoziiert im Vergleich zu Proben mit geringer Ezrinexpression (Khanna et al., 2004).

2.5. Biologisches Verhalten des appendikulären Osteosarkoms

Als Ursprung des Osteosarkoms wird in der Literatur der Markraum des Knochens angegeben. Das Wachstum ist charakterisiert durch die lokale Destruktion, die invasive, proximodistale Ausbreitung im Markraum und die Zerstörung spongiösen Knochens. Dies hat die fortschreitende Destruktion des kortikalen Knochens zur Folge und kann bei weiterer Progression zum Verlust der Statik, der Funktion und einer pathologischen Fraktur führen. Röntgenologisch lassen sich als Stabilisierungsversuch des Knochens klassische sklerotische Knochenverdichtungen im Markraum und periostale Knochenzubildungen beobachten (Kessler und Ammer, 2013).

Lokalisiert sind Osteosarkome zumeist metaphysär und in Gelenknähe. Dabei sind die Vordergliedmaßen doppelt so oft wie die Hintergliedmaßen betroffen (Langenbach et al., 1998). Am häufigsten erkranken der distale Radius und proximaler Humerus, gefolgt von distalem Femur und proximaler/distaler Tibia (Straw et al., 1990; Withrow et al., 2013). Osteosarkome überspringen aber nur sehr selten ein Gelenk (Kessler und Ammer, 2013; Withrow et al., 2013). Eine Ausnahme stellt der proximale Femur dar, hier kann eine Ausbreitung über das Ligamentum proprium auf das Becken erfolgen (Kessler und Ammer, 2013).

Eines der Hauptprobleme im Zusammenhang mit dieser Neoplasie ist die frühe hämatogene pulmonale Metastasierung. Die Lungenmetastasen können zusätzlich Ursache arterieller und venöser Thromben sein, die dann im weiteren Verlauf zu einer Embolie und plötzlichem Exitus führen können (Boston et al., 2006). 80 % der kaninen Osteosarkompatienten sterben aufgrund der pulmonalen Metastasierung (Szewczyk et al., 2015). Desöfteren finden sich zudem Metastasen in Knochen, der Leber, der Milz, den Nebennieren, im Gehirn und im Herzen (Gorman et al., 2006; Kessler und Ammer, 2013; Withrow et al., 2013). Knochenmetastasen haben dabei bessere Prognosen als Weichteilmetastasen (Boston et al., 2006). Die Wahrscheinlichkeit der Metastasenentwicklung scheint

von der Tumorlokalisation abhängig zu sein: Ein Osteosarkom des distalen Radius geht mit einem geringeren Metastasierungsrisiko einher, als ein solcher Tumor des proximalen Humerus, distalen Femurs oder der proximalen Tibia (Schmidt et al., 2013).

Lymphogene Metastasierung tritt in etwa 4,4-10 % der Fälle auf (Hillers et al., 2005; Kessler und Ammer, 2013). Kutane Metastasen hingegen sind sehr selten (Gorman et al., 2006). Das wesentlich gravierendere Problem sind allerdings die Mikrometastasen, die zu Beginn der tierärztlichen Evaluation noch nicht nachweisbar sind. Zum Zeitpunkt der ersten Vorstellung sind bei etwa 5-10 % der Patienten bereits Lungen- oder Knochenmetastasen festzustellen. Ein Jahr nach alleiniger Amputation sind jedoch bereits mehr als 90 % der erkrankten Tiere von der Metastasierung betroffen. Daher muss bereits bei Diagnosestellung die Existenz dieser Mikrometastasen im Hinterkopf behalten werden (Kessler und Ammer, 2013). Die Inzidenz von Knochen- und Weichteilmetastasen steigt nach chemotherapeutischer Behandlung an (Berg et al., 1995; Withrow et al., 2013).

2.6. Klinik des appendikulären Osteosarkoms

Klinisch fällt zuerst eine intermittierende, aber deutliche Lahmheit des betroffenen Beines auf (Morello et al., 2011; Kessler und Ammer, 2013; Withrow et al., 2013). Diese kann sich laut Besitzerangaben schleichend entwickelt haben oder zuerst auf ein Trauma zurück geführt werden. Der Schmerz wird ausgelöst durch die osteolytischen Vorgänge an der Kortex und Verletzungen des Periosts. Erst im fortgeschrittenen Stadium findet die Weichteilinvasion und die damit auftretende klassische Schwellung statt (Kessler und Ammer, 2013). Parallel nimmt der Lahmheitsgrad zu (Morello et al., 2011). Der palpatorische Befund unterliegt sehr großen Schwankungen von weich bis hart und ist oft mit Schmerzhaftigkeit verbunden (Morello et al., 2011; Kessler und Ammer, 2013). Eine akute, das Bein komplett entlastende Lahmheit kann Hinweis auf eine pathologische Fraktur sein (Morello et al., 2011).

Respiratorische Dysfunktionen treten selten auf, selbst im Falle von diagnostizierten pulmonalen Metastasen. Appetit und Wohlbefinden hingegen nehmen mit Fortschreiten der Krankheit deutlich ab (Kessler und Ammer, 2013).

2.7. Diagnostik des appendikulären Osteosarkoms

Initial sollte eine gründliche orthopädische Untersuchung mit Palpation der Schwellung durchgeführt und Röntgenaufnahmen in zwei Ebenen erstellt werden. Diese umfassen mediolaterale Aufnahmen der Gliedmaßenknochen inklusive benachbarter Gelenke, laterolaterale Wirbelsäulenaufnahmen und ventrodorsale Aufnahmen des Beckens (Wallack et al., 2002; Kessler und Ammer, 2013). Die röntgenologische Diagnostik dient der Evaluation des Primärtumors und extrathorakaler Metastasen (Straw et al., 1989b).

Typischerweise finden sich bei Osteosarkomen in der röntgenologischen Diagnostik unterschiedliche Kombinationen osteolytischer und knochenproliferativer Vorgänge (Gibbs et al., 1985). Ein Charakteristikum dieser Neoplasie stellt die Destruktion der Kortikalis dar, die in einer pathologischen Fraktur resultieren kann. Weiterhin lässt sich in etwa 50 % der Fälle das sogenannte „sunburst-Phänomen“ beobachten. Als solches werden ausgeprägte periostale Zubildungen und Knochenneubildungen bezeichnet, die sonnenstrahlenförmig als Spiculae von der Kompakta ausgehen. Ein zusätzlich häufig zu beobachtendes Merkmal ist das Codman'sche Dreieck, welches durch das invasive Tumorwachstum, die resultierende Periostabhebung und der Bildung neuen Knochengewebes zwischen Cambiumschicht und Periost entsteht. Das Codman'sche Dreieck ist jedoch nicht pathognomonisch für die Osteosarkomerkrankung (Wallack et al., 2002; Kessler und Ammer, 2013), sondern tritt auch bei anderen Krankheiten wie Ewing- und Chondrosarkom auf (Miamed, 2018). Die Wachstumsgeschwindigkeit kann anhand des Destruktionstypus und der Art der Läsionsbegrenzung beurteilt werden (Gibbs et al., 1984). Langsam wachsende Osteosarkome weisen einen schmalen Läsionsrand und ein weitgehend unversehrtes Periost auf, wohingegen aggressive Tumore durch infiltratives Wachstum und einen breiteren, verwaschenen Läsionsrand charakterisiert sind (Dieckmann, 2008).

Eine Sonographie des Abdomens kann zusätzliche Hinweise auf eine Osteosarkomerkrankung liefern. 75 % der kaninen Patienten mit dieser Neoplasie zeigten laut einer Studie Abnormalitäten, am häufigsten war die Milz betroffen. Läsionen in Leber und Nieren waren zudem mit kürzeren Überlebenszeiten

verbunden (Sacornrattana et al., 2013).

Zur weiteren diagnostischen Evaluation eignen sich die Computer- und Magnetresonanztomographie. Dabei ist die Computertomographie besonders zur Darstellung der Knochenveränderungen und des Metastasierungsstatus geeignet, während die Magnetresonanztomographie die Methode der Wahl für die Beurteilung der Weichteil- und Markraumausdehnung der Neoplasie darstellt (Wallack et al., 2002; Kessler und Ammer, 2013).

Als Ergänzung zu den tomographischen Untersuchungsmethoden sei die Szintigraphie zu nennen. Sie dient der Identifikation sehr kleiner Veränderungen und findet vorallem Anwendung im präoperativen Staging auf der Suche nach Knochenmetastasen (Forrest und Thrall, 1994; Jankowski et al., 2003; Gösling et al., 2010).

Bei vielen kaninen Knochentumoren findet sich eine erhöhte Aktivität der Alkalischen Phosphatase. Diese wird in der Literatur als prognostischer Marker genannt (Lucas et al., 2008). Zusätzlich lässt sich diese gesteigerte Aktivität in der histologischen Diagnostik in Form einer ALP-Färbung zur Abgrenzung von anderen primären Knochentumoren nutzen (Britt et al., 2007). Des Weiteren können erhöhte Werte des Knochenresorptionsmarker N-Telopeptid in Serum und Urin auf eine Osteosarkomerkrankung hinweisen (Lucas et al., 2008).

Zur Sicherstellung der Diagnose kann zusätzlich eine Biopsie entnommen und eine anschließende zytologische bzw. histopathologische Untersuchung durchgeführt werden. Hierzu gibt es die Möglichkeit der Feinnadelaspiration oder der inzisionellen histologischen Knochenbiopsie (Powers et al., 1988; Stockhaus et al., 2003; Britt et al., 2007). Die Gewebeentnahme sollte stets aus dem Läsionszentrum entnommen werden, da peripher vermehrt reaktives Knochengewebe lokalisiert ist. Bei der Feinnadelaspiration ist zu bedenken, dass von multiplen Läsionsstellen Zellen gesammelt werden sollten (Stockhaus et al., 2003). Besonders von Bedeutung für die korrekte Diagnosestellung ist hierbei die Probennahme aus den lytischen Läsionsanteilen; dieser Anteil ist gut erkennbar durch die weiche Beschaffenheit des Knochens (Kessler und Ammer, 2013). Der Nachteil der Gewebeentnahme für die histopathologische Untersuchung liegt in

der möglichen Transplantation von Tumorzellen in den Biopsiekanal (Henrichs et al., 2010).

2.8. Differentialdiagnosen des appendikulären Osteosarkoms

Differentialdiagnostisch kommen zunächst andere primäre Knochentumoren, wie das Chondro-, Fibro- und Hämangiosarkom in Frage. Bei Ausschluss dieser Neoplasien kommen zudem Knochenmetastasen, primär extraskelettale und benigne Tumoren wie beispielsweise das Osteoidosteom in Betracht. Auch infektiöse Erkrankungen wie eine bakterielle und mykotische Osteomyelitis oder ein Leishmaniosebefall des Knochens können Ursache ähnlicher Beschwerden sein. Zusätzlich sind degenerative, reparative oder autoimmune Knochenläsionen zu nennen (Kessler und Ammer, 2013).

2.9. Staging des appendikulären Osteosarkoms

Um die Ausmaße der Tumorausdehnung einschätzen und die entsprechend optimale Therapieoption wählen zu können, wird das Osteosarkom in Stadien nach Enneking eingeteilt (Enneking, 1989; Gösling et al., 2010). Des Weiteren erweist sich eine solche Einteilung als sehr nützlich zum Vergleich von Studien und Fallberichten.

Zur umfassenden Evaluation des Tumorstadiums sollten links und rechts anliegende, sowie ventrodorsale Röntgenbilder der Lunge erstellt und beurteilt werden. Zusätzlich wird eine Palpation der regionären Lymphknoten empfohlen. Bei einer Vergrößerung sollte zudem nachfolgend eine zytologische Untersuchung durchgeführt werden. Ergänzend kann die Ultraschall-, Computer- und Magnetresonanztomographie sowie die Szintigraphie für das Staging zum Einsatz kommen (Kessler und Ammer, 2013). Die Szintigraphie eignet sich hervorragend für den Nachweis von Knochenmetastasen (Gösling et al., 2010), jedoch erbringt sie keinen spezifischen Nachweis für eben solche, sondern detektiert allgemein Areale mit osteoblastischer Aktivität. Somit muss ebenfalls differentialdiagnostisch an Osteoarthritis und infektiöse Geschehen gedacht werden (Jankowski et al., 2003).

Die einteilende Beurteilung schließt den histologischen Grad (G), die anatomische Ausbreitung des Primärtumors (T), sowie lokale und Fernmetastasen (M) ein. Bei

allen Stadien wird zusätzlich noch zwischen intrakompartimentalen (A) und extrakompartimentalen (B) Tumoren unterschieden. Im Stadium I finden sich gut differenzierte Läsionen (G1) ohne Metastasierung. Dies tritt beim Hund allerdings äußerst selten auf, da der Großteil der kaninen Osteosarkome niedrig differenziert ist. Stadium II ist charakterisiert durch niedrige Differenzierung und hohe Malignität (G2) ohne Metastasen. Unter Stadium III fallen sämtliche Differenzierungen mit vorhandener Metastasierung (Enneking, 1989). Abbildung 1 zeigt eine Übersicht der Stadien in tabellarischer Form.

	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB
Grad	G1	G1	G2	G2	G1-2	G1-2
Lokalisation	T1	T2	T1	T2	T1	T2
Metastasen	M0	M0	M0	M0	M1	M1
Klinischer Verlauf	Wenig Schmerzen oder indolent, schleichendes Wachstum	Wenig Schmerzen oder indolent, tastbar, schleichendes Wachstum	Starke Schmerzen, massives Wachstum	Starke Schmerzen, massives Wachstum, tastbare Tumormasse, Spontanfraktur	Starke Schmerzen, massives Wachstum, systemische Symptome. Spontanfrakturen, tastbare Metastasen, Lungenmetastasen	
Szintigraphie	Vermehrte Anreicherung	Vermehrte Anreicherung	Vermehrte Anreicherung bis über die radiologischen Tumorgrenzen	Vermehrte Anreicherung bis über die radiologischen Tumorgrenzen	Vermehrte Anreicherung im Tumor bis über die radiologischen Tumorgrenzen, Anreicherung in Lungenmetastasen selten	
Röntgenbild (Lodwick-Grad)	II	II	II-III	II-III	II-III	II-III
MRT/CT	Irreguläre oder arrodierte Kapsel, aber im Kompartiment	Tumorausdehnung aus dem Kompartiment	Durchbrochene (Pseudo-) Kapsel – aber im Kompartiment	Durchbrochene (Pseudo-) Kapsel – außerhalb des Kompartiments	Durchbrochene (Pseudo-) Kapsel im bzw. außerhalb des Kompartiments, Lungenmetastasen oder vergrößerte Lymphknoten	

Abbildung 1: Enneking-Einteilung aus (Freyschmidt et al., 2010)

Anhand dieser Einteilung fallen der Großteil der kaninen Osteosarkome zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in das Stadium IIB oder III (Boston et al., 2006; Withrow et al., 2013).

2.10. Therapie des appendikulären Osteosarkoms

Nach eingehender Diagnostik inklusive Staging erfolgt die Entscheidung, welche Therapieform zum Einsatz kommen soll. Die Therapie des invasiv und infiltrativ wachsenden Osteosarkoms geht mit weiten bzw. radikalen Resektionsrändern (Abbildung 2) einher, um möglichst keine Tumorzellen im Operationsgebiet zu hinterlassen (Kessler und Ammer, 2013).

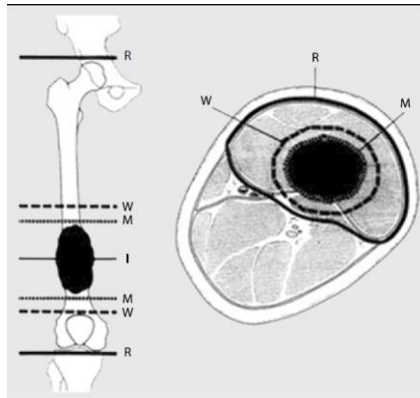


Abbildung 2: Verschiedene Arten von Resektionsrändern aus (Enneking et al., 1980)

Eine kurative Therapieintervention kann dabei aufgrund der frühen Metastasierung bisher nur in Kombination mit einem adjuvanten Vorgehen erreicht werden (O'Brien et al., 1993; Berg, 1996; Withrow et al., 2013). Ziel dabei ist die verbesserte Kontrolle über Primärtumorbett und –resektionsränder, die Eliminierung von Metastasen der reaktiven Zone und die Tumorzellnekrose zur Rezidivvermeidung (Mauldin et al., 1988; Powers et al., 1991).

Eine neoadjuvante Therapie kann im Vorfeld einer chirurgischen Maßnahme hilfreich sein, indem sie die Tumorausmaße verkleinert und besser zum umliegenden Gewebe abgrenzt. Dieses Vorgehen wird als „Downstaging“ bezeichnet (Bieling et al., 1991).

2.10.1. Amputation

Die radikale Therapieform der Amputation stellt bei appendikulären Osteosarkomen die Methode erster Wahl dar, da sie die Tumorentfernung in toto gewährleistet (Kessler und Ammer, 2013). Des Weiteren wird so das Risiko einer pathologischen Fraktur eliminiert und die Schmerzhaftigkeit deutlich reduziert

(Kirpensteijn et al., 1999).

Bei Osteosarkomen der Vordergliedmaße wird zur Amputation der gesamten Gliedmaße mitsamt Skapula geraten (Kessler und Ammer, 2013). Ist die Hintergliedmaße betroffen, ist die Amputationshöhe abhängig von der Tumorlokalisation. Osteosarkome distal des Kniegelenks werden mit einer Amputation im proximalen Femurdrittel bzw. im Hüftgelenk behandelt. Tumore des distalen Femurs bedürfen einer Amputation im Hüftgelenk (Kessler und Ammer, 2013). Im Falle von Femurkopftumoren hingegen ist aufgrund der Ausbreitungsmöglichkeit über das Ligamentum proprium die Azetabulektomie die Methode der Wahl (Kramer et al., 2008).

Hunde mit amputierten Gliedmaßen erholen sich in der Regel schnell ohne hohe Komplikationsrate und zeigen eine gute Beweglichkeit (Kirpensteijn et al., 1999; Von Werthern, 1999). Bei den beschriebenen Komplikationen handelt es sich um Blutverlust, Infektion sowie selten Embolie und postoperative Darmverschlingungen (Straw und Withrow, 1996). Es besteht mittlerweile die Möglichkeit einer Gliedmaßenprothese nach distalen Radius- und Tibiaamputationen. Kontraindikationen einer Amputation stellen orthopädische und neurologische Defizite der kontralateralen Gliedmaße sowie hochgradige Adipositas dar (Morello et al., 2011; Kessler und Ammer, 2013).

Leider führt die alleinige Therapie der Amputation aufgrund der meistens bereits vorhandenen Mikrometastasierung zu unzufriedenstellenden medianen Überlebenszeiten von nur drei bis vier Monaten (Spodnick et al., 1992).

2.10.2. Gliedmaßenerhaltende Chirurgie

Im Falle von Kontraindikationen einer Amputation oder Ablehnung durch die Patientenbesitzer kommt unter bestimmten Umständen eine gliedmaßenerhaltende chirurgische Therapie in Frage. Sind weniger als 50 % der Knochenlänge und nur eine Gliedmaße betroffen, sowie eine vollständige Resektion im Weichteilgewebe möglich, kann über eine gliedmaßenerhaltende Chirurgie nachgedacht werden. Aufgrund des invasiven Wachstums werden diese Voraussetzungen selten erfüllt und daher bleibt diese Vorgehensweise nur wenigen Patientenfällen vorbehalten (Dernell et al., 2001; Leibman et al., 2001;

Kessler und Ammer, 2013).

Die Wahl der Rekonstruktionsmethode richtet sich dabei vor allem nach Tumor- bzw. Defektlokalisation. Sind die Röhrenknochen betroffen, bedarf es zumeist einer zusätzlichen mechanischen Stabilisation mittels osteosynthetischer Platten (Straw et al., 1992a; Kirpensteijn et al., 1998).

Bis auf wenige Ausnahmen wurden mit dieser Behandlungsform die besten Resultate in Verbindung mit einer Arthrodeese des benachbarten Gelenks erzielt (Boston et al., 2007). Aufgrund dieser Tatsache beschränken sich die Anwendungsmöglichkeiten auf den distalen Radius, die distale Tibia und die Ulna (Morello et al., 2001; Kessler und Ammer, 2013). Die Anwendung der gliedmaßenerhaltenden Chirurgie bei anderen Tumorlokalisationen führte bisher zu keinen überzeugenden Resultaten und war zusätzlich mit einer höheren Komplikationsrate kombiniert (Kuntz et al., 1998b; Morello et al., 2001).

Alternativ dazu werden vor allem bei diaphysären Tumorlokalisationen gelenkübergreifende Allografts und Endoprothesen erfolgreich eingesetzt (Wittig et al., 2002; Liptak et al., 2005; Dieckmann et al., 2010). Das tumortragende Knochenkompartiment kann durch die Methode der allogenen Knochentransplantation substituiert werden. Hierbei wird ein Knochentransplantat aus einer Knochenbank nach Sterilisation implantiert. Nachteil ist die bekannte Transplantationsproblematik der viralen Infektionsgefahr (Kessler und Ammer, 2013). Eine weitere Möglichkeit ist die extrakorporale Devitalisierung des Tumors durch Pasteurisierung, Bestrahlung und/oder Autoklavieren, sowie die darauffolgende Reimplantation mit antibiotikumhaltigem Knochenzement (Buracco et al., 2002; Yamamoto et al., 2002; Morello et al., 2003; Boston et al., 2007; Dieckmann, 2008; Kessler und Ammer, 2013). Als Platzhalter für den resezierten Knochen kommen zusätzlich einfach zu handhabende Metallzylinder zum Einsatz, die die Problematik der Transplantatsuche, -verfügbarkeit und -infektionsgefahr umgehen (Kessler und Ammer, 2013).

Außerdem kann in bestimmten Fällen eine autogene Knochentransplantation durchgeführt werden. Hierbei wird in der Literatur vor allem von der

Ulnatransposition unter Schonung der kaudalen interossären Gefäße in das Resektionsgebiet des Radius berichtet (Séguin et al., 2003). Dabei ist jedoch die ulnaerhaltende komplette Tumoresektion Bedingung. Alternativ kommen die Transplantation proximaler, nicht vaskularisierter Ulnateile, sowie der kontralateralen Ulna oder einer Rippe in Frage. Allerdings besteht hierbei die Gefahr der Sequestrierung (Kessler und Ammer, 2013). Bei dem komplizierten Verfahren des Knochentransports nach Ilizarov kommt ein mobiles Ringfixationssystem zum Einsatz, das den übrig gebliebenen Knochen in das Resektionsbett verlängern soll (Ehrhart, 2005; Kessler und Ammer, 2013).

Größter Nachteil der gliedmaßenerhaltenden Chirurgie ist die hohe Wahrscheinlichkeit (24-25 %) eines Lokalrezidivs nach unvollständiger Tumoresektion (Calhoun und Mader, 1989; Straw und Withrow, 1996; Kessler und Ammer, 2013). Die Infektionsraten einer solchen chirurgischen Intervention liegen zwischen 30-44 % (Calhoun und Mader, 1989; Straw und Withrow, 1996), was interessanterweise signifikant längere Überlebenszeiten zur Folge hat (siehe Tabelle 2) (Lascelles et al., 2005). Eine sich auch gegen den Tumor richtende Immunreaktion, die eine kontinuierliche Stimulation der natürlichen Killerzellen und Makrophagen zur Folge hat, wird als mögliche Erklärung in der Literatur angegeben (Sottnik et al., 2010b). Bedingt durch eine Allotransplantatinfektion kann es beispielsweise während der Revaskularisierung zur Schraubenlockerung und in seltenen Fällen zur Fraktur der Osteosynthesenplatte kommen, was zum Zusammenbruch des orthopädischen Konstrukts (Implantatversagen) führen kann (Straw und Withrow, 1996; MacDonald und Schiller, 2010). Des Weiteren erfordern diese hochkomplizierten Operationstechniken ausgeprägte chirurgische Fähigkeiten und Erfahrung (Kessler und Ammer, 2013).

Voraussetzung für einen derartigen gliedmaßenerhaltenden chirurgischen Eingriff sollte immer die gründliche Aufklärung der Besitzer und deren Bereitschaft zu unangenehmen Entscheidungen sein, vor allem in Hinblick auf die hohe Komplikationsrate und der möglichen ultima ratio einer Amputation (Leibman et al., 2001; Kessler und Ammer, 2013).

2.10.3. Chemotherapie

2.10.3.1. Systemische Chemotherapie

Da die chirurgische Resektion des Tumors nichts gegen die Haupttodesursache des Osteosarkoms, die Metastasierung, ausrichten kann, ist die systemische Chemotherapie zur Bekämpfung der (Mikro-)metastasen unbedingt notwendig (Kessler und Ammer, 2013).

Auch die Monotherapie der systemischen Chemotherapie ist nicht das Mittel der Wahl. Empfohlen wird die Amputation in Kombination mit der möglichst früh beginnenden adjuvanten Chemotherapie, die jedoch aufgrund der Myelosuppression, Regeneration und Wundheilung nicht früher als eine Woche nach dem operativen Eingriff initiiert werden sollte (Berg, 1996; Kessler und Ammer, 2013; Withrow et al., 2013). Voraussetzung hierbei ist ein negativer Lungenmetastasenbefund (Kessler und Ammer, 2013), da die Existenz pulmonaler Metastasen die Prognose signifikant verschlechtert (Ogilvie et al., 1993).

Für die chemotherapeutische Behandlung des Osteosarkoms eignen sich die Platin-Derivate Cisplatin und Carboplatin, sowie Doxorubicin (Kessler und Ammer, 2013). Eine Kombination verschiedener Chemotherapeutika führt zwar nicht zu einer verbesserten Wirksamkeit, mildert jedoch die Nebenwirkungen (Selmic et al., 2014).

Cisplatin wird sowohl adjuvant, als auch neoadjuvant, also vor der Amputation, eingesetzt und verbessert in beiden Fällen die mediane Überlebenszeit (Straw et al., 1991). Allerdings scheint es keine große Wirksamkeit gegen Metastasen zu haben (Straw et al., 1991). Aufgrund der ausgeprägten Nephrotoxizität ist bei Wahl dieses Chemotherapeutikums auf eine ausreichende diuretische Behandlung zu achten (DeRegis et al., 2003). Als weitere Nebenwirkungen sind Emesis und Myelosuppression zu nennen (Kessler und Ammer, 2013).

Carboplatin verhält sich hinsichtlich der Myelosuppression (neutrophile Granulozyten und Thrombozyten) und der Überlebenszeiten ähnlich wie Cisplatin (Kessler und Ammer, 2013), hat aber zusätzlich Einfluss auf den intratumoralen Blutfluss (DiResta et al., 2008). Carboplatin wirkt jedoch weniger nephrotoxisch als Cisplatin, eine Diuresebehandlung ist damit hinfällig. Die einfachere Anwendung

macht dieses Chemotherapeutikum damit zum Mittel erster Wahl (Kessler und Ammer, 2013).

Doxorubicin wird als Monotherapie oder als kombinierte Therapie mit Platinderivaten eingesetzt. Es zeichnet sich durch eine etwas geringere Wirksamkeit als Cis- und Carboplatin aus (DeRegis et al., 2003). Kontraindikationen stellen Kardiomyopathien dar (Kessler und Ammer, 2013).

Die Behandlungsempfehlung besteht derzeit aus 6-8 Applikationen Carboplatin (300 mg/m^2) alle 21 Tage beginnend 7-10 Tage nach Amputation (Phillips et al., 2009). Ein weiteres etabliertes Protokoll beinhaltet vier alternierende Applikationen von Carboplatin (300 mg/m^2) und Doxorubicin (30 mg/m^2) (Bailey et al., 2003; Kent et al., 2004). Die fraktionierte Applikation der Chemotherapeutika dient einerseits dem Schutz des umliegenden Gewebes, das sich schneller regenerieren kann als neoplastisches Gewebe. Andererseits kommt es in der Zeit zwischen den Applikationen zur Reoxygenierung hypoxischer Tumoranteile, die somit wieder sensitiv für chemotherapeutische Interventionen werden (Nolte et al., 2001). Der chemotherapeutische Behandlungszyklus schließt regelmäßige hämatologische Untersuchungen zur Evaluation der nephrologischen Toxizität und Myelosuppression ein (Kessler und Ammer, 2013).

2.10.3.2. Lokale und lokoregionale Chemotherapie

Außer einer systemischen Anwendung der genannten Chemotherapeutika kommt zusätzlich die lokale bzw. lokoregionale Chemotherapie in Betracht. Dazu zählen die Verabreichung mit Zytostatika behandelter Schwämme oder Granula, sowie die intraarterielle Applikation von Chemotherapeutika (Hernigou et al., 1989; O'Brien, 1993; Hahn et al., 1996; Withrow et al., 2004; Mehl et al., 2005).

Beispielsweise wurde open cell polylactic acid-Platin (OPLA-Pt), ein biokompatibles und mit Cisplatin behandeltes Polymer als Granulat oder Schwamm, in einer kaninen Studie erfolgreich eingesetzt. Die gliedmaßenenerhaltende Chirurgie wurde mit dem in das Resektionsbett verbrachte OPLA-Pt und einer systemischen Cisplatin-Chemotherapie kombiniert. Mehr als drei Cisplatinbehandlungen inklusive lokaler Applikation von OPLA-Pt führten zu signifikant längeren Überlebenszeiten (O'Brien, 1993).

Andere Studien testeten Polymethylmethacrylat (PMMA), ein Knochenzement, bei dessen Aushärtung Temperaturen um die 90°C erreicht werden. Es wurden dabei unterschiedlichen Dosen Methotrexat (gewichts- und größenabhängig) im Rahmen eines extremitätenerhaltenden Therapiekonzeptes mit dem Knochenzement kombiniert. Die mediane Überlebenszeit variierte dosisunabhängig bei den Studien zwischen 7,5-18 Monaten, 11 % der kaninen Patienten überlebten zwei Jahre (Hernigou et al., 1989; Kessler und Ammer, 2013). Bei mehreren Studienteilnehmern musste später eine Amputation durchgeführt werden oder es kam zu Rezidiven (Kessler und Ammer, 2013).

Eine intraarterielle Verabreichung von Chemotherapeutika, auch isolated limb perfusion (ILP) genannt, wurde bereits erfolgreich am kaninen Patienten angewandt. Eine örtliche Hyperthermie kann helfen den Behandlungserfolg der ILP zu steigern (Van Ginkel et al., 1995). Allerdings kommt es je nach Chemotherapeutikum und Dosis aufgrund von Neuro- und Weichteiltoxizität zu unterschiedlichen Nebenwirkungen (Dernell, 1999).

Die intramedulläre Applikation von Cisplatin ist eine Möglichkeit bei inoperablen Osteosarkomen, allerdings sind die Outcomes sehr unterschiedlich und reichen von kompletter Remission bis hin zu keinerlei Therapieerfolg (Gorman et al., 2006).

2.10.4. Strahlentherapie

Aus Gründen der Strahlungsresistenz kommt die Radiotherapie bisher hauptsächlich palliativ bei inoperablen kaninen Osteosarkomen zur Anwendung (Coomer et al., 2009). Primäre Ziele sind dabei die Schmerz- und Lahmheitsreduktion und damit Verbesserung der Lebensqualität (Morello et al., 2011). Die analgetische Effektivität und Dauer variiert zwischen 50-93 % und 53-180 Tagen (Ramirez et al., 1999; Mueller et al., 2005; Morello et al., 2011). Daher wird die Strahlentherapie zumeist in Kombination mit anderen Therapiemethoden angewandt.

Der therapeutische Ansatz einer adjuvanten systemischen Chemotherapie kombiniert mit fraktionierter Strahlentherapie (Gesamtdosis 57 Gy) führte in einer Studie zu unzufriedenstellenden Überlebenszeiten von ca. 7 Monaten (Walter et

al., 2005).

Zum Therapieerfolg beitragen kann die Radiotherapie durch präoperative (neoadjuvante) Bestrahlung, die darauffolgende Tumornekrose und eine daraus resultierende höhere Wahrscheinlichkeit der kompletten Tumorentfernung (Kessler und Ammer, 2013). Die palliative Bestrahlung von metastatischen appendikulären Osteosarkomen im Stadium III führte zu längeren Überlebenszeiten im Vergleich zur monotherapeutischen Amputation (Barnard et al., 2007). Allerdings hat eine zu hohe Strahlendosis den Nachteil der verzögerten Wundheilung und folglich erhöhten Infektionsgefahr (Thrall et al., 1990).

Nach Vorbild der Humanmedizin hält die stereotaktische Radiochirurgie auch in der Veterinärmedizin Einzug. Mit Hilfe eines am Schädel befestigten Stahlrings erfolgt im CT eine exakte Planung der Bestrahlung im Rahmen der Behandlung von Kieferosteosarkomen, die dann mit dem Linearbeschleuniger durchgeführt wird. Es können hohe Dosen im Tumor platziert und gleichzeitig das gesunde periphere Gewebe geschont werden (Kessler und Ammer, 2013). Eine Studie an Hunden führte zu Überlebenszeiten von ca. einem Jahr, mehrere Patienten erlitten jedoch pathologische Frakturen (Farese et al., 2004).

2.10.5. Chirurgische Metastasenresektion

Wie beim menschlichen Patienten wird auch in der Tiermedizin unter gewissen Umständen die chirurgischen Resektion pulmonaler Metastasen zur Verlängerung der Lebenszeit durchgeführt (Belli et al., 1989; O'Brien et al., 1993). In bestimmten Fällen kann der Eingriff minimal-invasiv durchgeführt werden (Lansdowne et al., 2005). Eine Studie berichtet von neuen Lungenmetastasen nach drei Monaten in 50 % der Fälle (Withrow, 1988).

Zu diesen Voraussetzungen gehört ein gutes Allgemeinbefinden, optimalerweise über 300 Tage andauernde Remission und ein negativer Knochenmetastasenbefund in der Szintigraphie. Ausschlusskriterien sind Befall der Thoraxwand und des Mediastinums, sowie mehr als 1-2 röntgenologisch nachweisbare Lungenmetastasen (d.h. > 5 mm) (Kessler und Ammer, 2013). Bei Diagnosestellung bereits vorhandener und nach Chemotherapie auftretender Metastasen gelten als insensitiv gegenüber einer weiteren chemotherapeutischen

Intervention und verschlechtern die Prognose (Ogilvie et al., 1993; Withrow et al., 2013).

2.11. Übersicht über Überlebenszeiten verschiedener Therapieformen

Tabelle 2 gibt einen Überblick über verschiedene Therapien und deren mediane Überlebenszeiten bei kaninen Osteosarkompatienten.

Tabelle 2: Überlebenszeiten verschiedener Therapiemaßnahmen des appendikulären Osteosarkoms. Modifiziert nach (Kessler und Ammer, 2013).

Therapieform	Mediane Überlebenszeit	Komplikationen	ÜZ ≥1 Jahr	ÜZ ≥2 Jahre	Referenz
Alleinige Amputation	3-5 Monate	Infektion	10-11,5 %	2-4 %	(Spodnick et al., 1992) (Straw et al., 1991) (Berg et al., 1997)
Gliedmaßen-erhaltende Chirurgie	Knochenzement + Methothrexat: 7,5- 18 Monate	Bei Knochen-transplantat + Knochen-zement: 24-25 % Lokalrezidiv, sekundäre Amputation	60 %	11 %	(Kessler und Ammer, 2013) (Straw und Withrow, 1996) (Calhoun und Mader, 1989)
+ Wund-infektion (30-44 %)	685 Tage				(Lascelles et al., 2005) (Liptak et al., 2006)
Chirurgische Metastas-ektomie	176 Tage (Durchschnitt ÜZ nach Ektomie) Gesamtüber-lebenszeit: 487 Tage	Rezidiv	k.A.	k.A.	(O'Brien, 1993)
Adjuvante Cisplatin-therapie	10-12 Monate (je nach Dosisanzahl)	Nephro-toxizität, Myelo-suppression, Emesis, Anaphylak-tischer Schock	40-55 %	20-30 %	(Straw et al., 1991) (Thompson und Fugent, 1992) (Shapiro et al., 1988) (Berg, 1996) (Hahn et al., 1997)

(Neo) adjuvante Doxorubicin-Therapie (30 mg/ m ²) i.v. 5x alle 2 Wochen	366 Tage	Myelo-suppression	50,5 % 35 %	9,7 % 17 %	(Berg et al., 1995) (Moore et al., 2007)
adjuvant 4x Carboplatin (300 mg/m ²) i.v. Alle 3 Wochen	307 Tage 321 Tage 479 Tage	Gastro-intestinale Toxizität	35,4 %	k.A.	(Phillips et al., 2009) (Kessler und Ammer, 2013) (Skorupski et al., 2016)
Adjuvante Kombination aus Carboplatin (300 mg/m ²) und Doxorubicin (30 mg/ m ²) 3x alle 3 Wochen	258 Tage 309 Tage 287 Tage	Gastro-intestinale Toxizität Myelo-suppression	48 %	18 %	(Bacon et al., 2008) (Kent et al., 2004) (Skorupski et al., 2016)
2x Ifosfamid (375 mg/m ²)	95 Tage	Geringe anti-Tumoraktivität	k.A.	k.A.	(Batschinski et al., 2011)
Adjuvant 4x Lobaplatin (35 mg/m ²) alle 3 Wochen	k.A.	Emesis, Depression, Thrombo-, Leuko-, Neutropenie	31,8 %	k.A.	(Kirpensteijn et al., 2002b)
Strahlentherapie + Pamidronat	69 Tage	k.A.	k.A.	k.A.	(Oblak et al., 2012)
Adjuvante systemische Chemotherapie + fraktionierte Bestrahlung (57 Gy)	7 Monate	k.A.	k.A.	k.A.	(Walter et al., 2005)
Stereotaktische Radiochirurgie	12 Monate	Pathologische Frakturen	k.A.	k.A.	(Farese et al., 2004)

ÜZ= Überlebenszeit, i.v.= intravenös, k.A.= keine Angabe

2.12. Prognose und Outcome des appendikulären Osteosarkoms

Das aggressive biologische Verhalten und die schnelle Metastasierung des Osteosarkoms resultieren in einer meist vorsichtigen Prognose (Kessler und Ammer, 2013). Selbst eine komplette Resektion durch eine hohe Amputation ohne zusätzliche Therapiemaßnahmen führt zu kurzen medianen Überlebenszeiten von 123 Tagen (Spodnick et al., 1992). Prognostisch besteht kein Unterschied zwischen einer alleinigen Amputation und alleiniger gliedmaßenerhaltender Chirurgie. Zur signifikanten Verlängerung der medianen Überlebenszeit bedarf es adjuvanter chemotherapeutischer Interventionen (Kessler und Ammer, 2013).

Die Überlebensrate bei adjuvanter Cisplatintherapie liegt bei über 12 Monaten in 50 % der Fälle. Zum Vergleich: Bei einer monotherapeutisch ausgeführten Amputation liegt diese Überlebensrate bei unter zehn Prozent (Kraegel et al., 1991). Die Überlebenszeit korreliert außerdem mit der Behandlungshäufigkeit (Kraegel et al., 1991). Die mediane Überlebenszeit bei Amputation kombiniert mit Carboplatin beträgt zwischen 307-321 Tagen (Phillips et al., 2009; Kessler und Ammer, 2013).

Die Existenz pulmonaler Metastasen verschlechtert die Prognose signifikant (Ogilvie et al., 1993).

Als prognostische Faktoren sind bisher die anatomische Lage des Tumors, Rasse und Alter, Kastrationsstatus, fortgeschrittenes Tumorstadium, histologischer Grad, Infektion und bestimmte veränderte Laborparameter bekannt (Boerman et al., 2012; Kessler und Ammer, 2013). Einen Überblick gibt Tabelle 3.

Proximal von Karpal- und Tarsalgelenk lokalisierte Osteosarkome besitzen eine schlechtere Prognose als distal gelegene (Gamblin et al., 1995). Hier sei vor allem der (proximale) Humerus zu nennen. Ist die Neoplasie dort lokalisiert, verkürzt sich die mediane Überlebenszeit um 132 Tage verglichen mit einer anderen appendikulären Lokalisation. Die mediane Remissionsdauer nimmt um 110 Tage ab (Boerman et al., 2012). Mit Ausnahme der Mandibula, haben auch nicht-appendikuläre Osteosarkome eine ähnlich vorsichtige Prognose, extraskelettale Osteosarkome sogar eine noch schlechtere (Kosovsky et al., 1991; White, 1991; Straw et al., 1996).

Im Rahmen der Rasseprädisposition seien vor allem die Greyhounds zu nennen. Osteosarkome dieser Rasse sind hochmaligne und gehen mit sehr kurzen Überlebenszeiten einher (Rosenberger et al., 2007; Kessler und Ammer, 2013).

Über die prognostische Bedeutung des Alters wird in der Literatur unterschiedlich berichtet. Bei Hunden, die jünger als vier bis fünf Jahre alt sind, häufen sich Osteosarkome hohen Grades mit einhergehender schlechterer Prognose (Loukopoulos und Robinson, 2007; Phillips et al., 2009; Saam et al., 2011). Aber auch ein erhöhtes Alter (> 10 Jahre) wird mit kürzeren Remissionen und Überlebenszeiten in Verbindung gebracht (Spodnick et al., 1992; Boerman et al., 2012).

Kanine Patienten mit Stadium III-Tumoren inklusive Fernmetastasen haben ebenfalls eine sehr vorsichtige Prognose. Lymphknotenmetastasierung besitzt insgesamt die schlechteste Prognose, die mediane Überlebenszeit beträgt hier 59-76 Tage (Hillers et al., 2005; Boston et al., 2006).

Erhöhte Werte der Alkalischen Phosphatase (ALP), vor allem der bone alkaline phosphatase (BALP), verkürzen die mediane Überlebenszeit signifikant auf 5,5 Monate, im Vergleich zu 12,5 Monaten bei normalen serum alkaline phosphatase (SALP)-Werten (Ehrhart et al., 1998; Garzotto et al., 2000; Kirpensteijn et al., 2002a; Hillers et al., 2005; Moore et al., 2007). Aber auch erhöhte SALP-Werte führen zu einer um 132 bis 186 Tage verkürzten medianen Überlebenszeit und eine um 123 Tage verkürzte Remission im Vergleich mit SALP-Werten im Referenzbereich (Boerman et al., 2012).

Eine weitere Studie nennt zudem das totale Serumcholesterol als potentiellen prognostischen Faktor bei kaninen Osteosarkomen: Bei 45,3 % der Patienten lag das totale Serumcholesterol über den Referenzwerten. Im Vergleich dazu war dies bei den Kontrollgruppen nur bei 6,5-10 % der Fall. Nach einer Kombinationstherapie (Amputation und Carboplatin-Chemotherapie) überlebten die Hunde mit erhöhtem totalen Serumcholesterol signifikant länger (Mediane Überlebenszeit (MÜZ) 455 Tage), als solche mit Werten im Referenzbereich (MÜZ 252 Tage). Eine mögliche Erklärung wäre ein Einfluss der Hypercholesterolämie auf Differenzierung und Proliferation der Osteoblasten (Leeper et al., 2017).

Aus hämatologischer Sicht sind bisher als negative prognostische Faktoren eine Erhöhung der regulatorischen T-Zellen und eine Erniedrigung der CD8⁺-T-Zellen bekannt (Biller et al., 2010). Zusätzlich stehen erhöhte periphere Monozyten- (>400/ μ l) und Lymphozytenwerte (>1000/ μ l) vor Behandlungsstart im Zusammenhang mit kürzeren Remissionszeiten (disease free interval = DFI) (Sottnik et al., 2010a).

Mit Fortschreiten der diagnostischen, technischen Möglichkeiten gewinnen immunologische, molekulare und genetische Methoden an Bedeutung (Selvarajah und Kirpensteijn, 2010). Eine Überexpression der Cyclooxygenase 2 (COX-2) war bei einer kaninen Studie mit deutlich schlechteren Überlebenszeiten vergesellschaftet (Mullins et al., 2004). Ein COX-Inhibitor kam in diesem Zuge bereits als adjuvante Therapieoption zum Einsatz (Langova et al., 2004).

Ezrin, ein Protein, das Basalmembran und Zytoskelett verbindet, wird als prognostischer Faktor der Metastasierung von Osteosarkomen kaniner Patienten beschrieben (Kim und Helman, 2009). Der Nachweis gelang in 83 % der kaninen Osteosarkomgewebeprobe nach Aufbereitung mittels Gewebe-Microarray (Khanna et al., 2004).

Tabelle 3: Überblick über prognostische Faktoren des Osteosarkoms

Prognostischer Faktor	Spezifikation	Prognose	Mediane Üz	Referenz
Anatomische Lage	OS proximal von Karpal- & Tarsalgelenk	Schlechter als distal gelegene	k.A.	(Gamblin et al., 1995) (Boerman et al., 2012)
	Extraskelettale OS	Sehr schlecht	k.A.	(KOSOVSKY et al., 1991) (Straw et al., 1996) (White, 1991)
	Mandibula	Beste Prognose	k.A.	(KOSOVSKY et al., 1991) (Straw et al., 1996) (White, 1991)
	Rippe, Skapula	Sehr schlecht	12 Tage	(Bergman et al., 1996) (Hammer et al., 1995)
Rasse	Greyhounds	schlecht	k.A.	(Kessler und Ammer, 2013)
Alter	< 4 Jahren	schlecht	k.A.	(Loukopoulos und Robinson, 2007)
Gewicht	Hohes Gewicht	schlecht	k.A.	(Hammer et al., 1995) (Ru et al., 1998)

Mitoserate	Je höher	Desto schlechter	k.A.	(Moore et al., 2007)
Tumorgröße	Je größer	Desto schlechter	k.A.	(Dieckmann, 2008)
Tumorstadium	Je höher, desto schlechtere Prognose	schlecht bei Stadium III mit Fern-metastasen	76 Tage (Stadium III)	(Loukopoulos und Robinson, 2007) (Boston et al., 2006)
	Lnn.-Metastasierung	sehr schlecht	59 Tage	(Hillers et al., 2005) (Boston et al., 2006)
Tumornekrose nach Chemo-/Strahlentherapie	Je größer prozentuale Tumornekrose, desto bessere lokale Kontrolle	k.A.	k.A.	(Powers et al., 1991)
Metastasierung zum Zeitpunkt der Diagnose	Bereits vorhanden (pulmonal oder in Lnn.)	schlecht	k.A.	(Dieckmann, 2008) (Dernell et al., 2001)
Lnn.-Metastasen	k.A.	schlecht	48 Tage	(Hillers et al., 2005)
Alkalische Phosphatase	erhöhte SALP/TALP und BALP	Schlechter als bei physiologischen ALP-Werten	5,5 -9,5 Monate (12,5-16,6 Monate bei phys. Werten)	(Ehrhart et al., 1998) (Garzotto et al., 2000) (Hillers et al., 2005) (Kirpensteijn et al., 2002a) (Moore et al., 2007)
COX-2	Erhöhte Expression	Schlechter als bei norm. Expression	k.A.	(Mullins et al., 2004)
Totales Serumcholesterol	Werte über Referenzwert	Bessere Prognose	455 Tage	(Leeper et al., 2017)
Regulatorische T-Zellen	Erhöhte Zahl	schlechter	k.A.	(Biller et al., 2010)
CD8⁺-T-Zellen	Erniedrigte Zahl	schlechter	k.A.	(Biller et al., 2010)
Periphere Monozyten- und Lymphozytenzahl	Monozyten >400/μl Lymphozyten >1000/μl	schlechter	<u>Med. DFI:</u> MZ: 202 Tage LZ: 267 Tage	(Sottnik et al., 2010a)

BALP= Bone alkaline phosphatase, COX-2= Cyclooxygenase-2, Med. DFI= median disease free interval, k.A.= keine Angabe, LZ= Lymphozyten, MZ= Monozyten, OS= Osteosarkom, SALP= serum alkaline phosphatase, TALP= total alkaline phosphatase, ÜZ= Überlebenszeit.

Der Erfolg einer Behandlung des Osteosarkoms hängt maßgeblich vom Zeitpunkt der Diagnose, dem Tumorstadium, der Metastasierung und deren Lokalisation ab. Die größte Herausforderung ist und bleibt dabei der Kampf gegen die Metastasen (Dieckmann, 2008).

2.13. Alternative und innovative Therapiekonzepte bei Mensch und Hund

2.13.1. Immuntherapie

Der in Liposomenkapseln verpackte Wirkstoff Muramyltripectid-Phosphatidylethanolamin (L-MTP-PE, Mifamurtid) wird als immunmodulatorisches Therapeutikum im Rahmen von Osteosarkomkrankungen eingesetzt. Die signifikante Erhöhung der Überlebenszeiten basiert auf einer gesteigerten tumorschädigenden Monozyten- und Makrophagenaktivität (MacEwen et al., 1989; Shi et al., 1993).

Eine monotherapeutische Anwendung des Immunmodulators nach Amputation führt bereits zu signifikant längeren Überlebenszeiten von median 7,3 Monaten im Vergleich zu median 3 Monaten (Kontrollgruppe) (MacEwen et al., 1989). Die besten Überlebenszeiten lassen sich jedoch mit einer Kombinationstherapie bestehend aus Amputation, viermaliger chemotherapeutischer Anwendung von Cisplatin über 28 Tage und anschließender Immuntherapie mit L-MTP-PE zwei Mal wöchentlich über 8 Wochen erzielen: 14,5 Monate im Vergleich zu 9,8 Monaten bei alleiniger Cisplatintherapie nach Amputation. Außerdem waren die metastasenfreien Intervalle signifikant länger im Vergleich zu Placebo-Liposomen. Entscheidend dabei ist der zeitversetzte Einsatz von Immunmodulator und Chemotherapie. Eine parallele Anwendung hat keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit. Die Verträglichkeit ist sehr gut, lediglich eine temporäre Erhöhung der Körpertemperatur um 1-2°C wurde beobachtet (MacEwen und Kurzman, 1996).

L-MTP-PE ist unter dem Handelsnamen Mepact® seit 2009 in Europa auf dem Markt. Limitierender Faktor hierbei ist allerdings ein hoher Preis (Kessler und Ammer, 2013).

2.13.2. Matrix-Metalloproteinasen-(MMP)-Inhibitoren

Aufgrund der Beteiligung von Matrix-Metalloproteinasen-2 und -9 an Wachstum und Metastasierung humaner und kaniner Neoplasien kam die Idee auf, die MMP-Inhibition therapeutisch zu nutzen (Foukas et al., 2002; Ferrari et al., 2004; Bjørnland et al., 2005). Der MMP-Inhibitor BAY 12-9566 kam bereits im Rahmen von *in vivo*-Versuchen in der Maus zum Einsatz und besaß tumorschädigende

Eigenschaften bei Mammakarzinomen (Nelson et al., 2000). Eine klinische Studie mit Hunden konnte jedoch bei oraler Gabe von BAY 12-9566-Tabletten (Dosis 10mg/kg) in Kombination mit einer Doxorubicin-Therapie keine signifikante Verbesserung der Überlebenszeiten feststellen (Moore et al., 2007). Das Medikament ist für den Hund nicht zugelassen auf dem deutschen Markt.

2.13.3. Aminobisphosphonate

Bisphosphonate imitieren als synthetische Analoga in niedrigen Dosen die hemmende Wirkung des anorganischen Pyrophosphats auf die Knochenresorption ohne dabei Einfluss auf die Knochenmineralisation zu nehmen. Diese suppressive Wirkung basiert hauptsächlich auf einer verminderten Osteoklastenaktivität. Anwendung finden Aminobisphosphonate in der Reduktion von Knochenmetastasenschmerzen (Ashton et al., 2005; Fan et al., 2005; Fan et al., 2007; Fan et al., 2008).

Die Bisphosphonate **Pamidronat** und **Zoledronat** werden intravenös verabreicht, wobei auf die Nierenfunktion geachtet werden muss (Fan et al., 2005; Spugnini et al., 2009). Pamidronat verbesserte in einer kaninen Studie signifikant die Schmerzsymptomatik und Knochendichte im Tumorbereich und erhöhte damit die Gliedmaßenfunktion. Die Überlebenszeit konnte in Kombination mit einer palliativen Radiotherapie jedoch nicht verlängert werden (Fan et al., 2008; Kessler und Ammer, 2013). **Alendronat** hingegen ist für die orale Gabe geeignet, kann jedoch Ösophagusnekrosen induzieren (Peter et al., 1998; Tomlin et al., 2000).

In vitro-Versuche zeigten zusätzlich zytotoxisches, zytostatisches und antiangiogenes Potential, das in Zukunft für therapeutische Zwecke genutzt werden könnte (Poirier et al., 2003; Kessler und Ammer, 2013).

2.13.4. Tetrathiomolybdat (TM)

Im Kampf gegen die Mikrometastasierung konzentriert sich ein neuer Ansatz auf die Inhibition der Neovaskularisation mit Hilfe des Kupferchelators Tetrathiomolybdat. Dies begründet sich mit der stimulierenden Wirkung von Kupfer auf die Angiogenese (Raju et al., 1982; Parke et al., 1988). Ursprünglich entwickelt für die Behandlung von Morbus Wilson, findet es nun auch Anwendung in der Krebstherapie. Nach oraler Aufnahme des TM bildet es einen dreiteiligen

Komplex mit Kupfer und Albumin und steht den Zellen und einer Angiogenese nicht mehr zur Verfügung. Dieser Kupferchelator zeichnet sich durch eine schnelle und kupferspezifische Wirksamkeit sowie geringe orale Toxizität aus (Brewer et al., 1991). Mehrere *in vivo*-Studien wurden bereits mit Nagern erfolgreich im Zusammenhang mit verschiedenen neoplastischen Erkrankungen durchgeführt (Cox et al., 2001; Khan et al., 2002; Pan et al., 2002; Van Golen et al., 2002). Ergebnisse einer *in vivo*-Studie mit TM in Kombination mit Adriamycin an kaninen Osteosarkompatienten liegen noch nicht vor. Diese TM-Adriamycin-Kombination inhibiert antioxidative Zellmechanismen und könnte somit eine zusätzliche potente Therapiemöglichkeit darstellen (Kleinerman, 2014).

2.13.5. Aerosoltherapie

Diese noninvasive Therapieform zielt besonders auf pulmonale Mikrometastasen ab und eignet sich zur Applikation von aerosolischen Chemo- (Gemcitabin) und Immunotherapeutika (Interleukin-2) (Kleinerman, 2014). *In vivo* wurden bisher Studien an Menschen (Huland et al., 2004; Lemarie et al., 2011), Mäusen (Koshkina und Kleinerman, 2005; Guma et al., 2014) und Hunden (Rodriguez Jr et al., 2010) durchgeführt. Kaninen Osteosarkompatienten mit ausgeprägter Metastasierung wurde hierbei Aerosol-Gemcitabin verabreicht. Die Aerosol-behandelten Metastasen wiesen zentral intratumoral deutlich höhere Apoptose- und Nekroseraten als unbehandelte Metastasen auf. Es konnte histologisch eine geringe toxische Wirkung auf die Atemwege beobachtet werden. Eine Kombination von Amputation, Carboplatin und Aerosol-Gemcitabin führte zu medianen Überlebenszeiten von 24 Monaten bei neun Hunden. In Planung sind weiterführende Studien in Kombination mit anderen Chemo- und/oder Immunotherapeutika (Rodriguez Jr et al., 2010).

2.13.6. Nanopartikeltherapie

Als neue Applikationsart von Chemotherapeutika wurden die STEALTH-Liposome mit inkapsuliertem Cisplatin entwickelt. Diese Liposome sind Nanocarrier und sollen das Chemotherapeutikum langsam in der sauren Umgebung des Tumorgewebes abgeben und somit lokal höhere Konzentrationen erreichen (Szewczyk et al., 2015). Die Wirkung dieser Liposomen (SPI-77) wurde in einer

klinischen Studie an Hunden untersucht. Eine dreimalige Dosis von 350 mg/m² intravenös alle 3 Wochen erzielte aber vergleichbare Ergebnisse im Vergleich zu einer Standardtherapie mit Carboplatin (Vail et al., 2002).

2.13.7. Meloxicam und Piroxicam

In vitro konnte der inhibierende Einfluss dieser nichtsteroidalen Antiphlogistika auf das Osteosarkomzellenwachstum nachgewiesen werden. Die Wirkung ist dabei dosis- und zeitabhängig (Knottenbelt et al., 2006; Wolfesberger et al., 2006). Meloxicam und Piroxicam hemmen die Enzymgruppe der Cyclooxygenasen, speziell die Cyclooxygenase-2 (COX-2). Die Überexpression der COX-2 in kaninen und humanen Osteosarkomen könnte eine mögliche Erklärung für die Wachstumsinhibition sein (Pang et al., 2014). *In vivo* Studien stehen noch aus.

3. Vergleich des kaninen und humanen Osteosarkoms

Das Osteosarkom gilt sowohl beim humanen, als auch kaninen Patienten als prognostisch ungünstige Erkrankung. Aufgrund ähnlicher Risikofaktoren, einem vergleichbaren Verlauf und der Hauptproblematik der frühen hämatogenen Metastasierung gewinnt der Hund als Tiermodell für die Osteosarkomforschung immer weiter an Bedeutung.

3.1. Epidemiologie

Verglichen mit dem kaninen Osteosarkom tritt die humane Form mit einem bis drei Fällen pro einer Millionen weltweit 10-30 mal seltener auf (Goorin et al., 1985; Withrow et al., 1991; Rowell et al., 2011). Die Mehrheit der Patienten (70-75 %) ist zum Zeitpunkt der Diagnose zwischen 10 und 25 Jahren alt (Sim et al., 1993). Hier tut sich ein entscheidender Unterschied zum kaninen Osteosarkom auf: Hunde erkranken eher im mittleren bis hohen Alter (Withrow et al., 2013). Die seltene extraskelettale Form betrifft beim Menschen jedoch hauptsächlich Patienten, die älter als 30 Jahre sind (Sim et al., 1993). Kanine Patienten mit dieser ebenfalls seltenen Form sind in den meisten Fällen bereits in höherem Alter (Kuntz et al., 1998a; Langenbach et al., 1998). Jedoch geht eine Erkrankung in sehr jungem Alter bei beiden Spezies mit einer sehr schlechten Prognose einher (Taylor et al., 1985; Bentzen et al., 1988; Group, 1988; Spodnick et al., 1992).

Beim Menschen schienen männliche Individuen bisher häufiger zu erkranken (Verhältnis m:w 1,5:1) (Sim et al., 1993). Lange ging man auch bei Hunden von einer ähnlichen Geschlechterverteilung aus, jedoch zeigen neuere Studien bei beiden Spezies eine relativ ausgeglichene Verteilung auf (Ottaviani und Jaffe, 2009; Withrow et al., 2013; Belanger et al., 2017).

Analog zum Hund ist das Osteosarkom auch beim Menschen zumeist an den Metaphysen langer Röhrenknochen lokalisiert. 50 % aller Fälle betreffen das Knie (Sim et al., 1993), hierbei handelt es zu 45 % um den distalen Femur, gefolgt von proximaler Tibia (15-20 %) und distalem Humerus (10 %) (Fletcher et al., 2002; Fuchs und Pritchard, 2002; Freyschmidt et al., 2010). Jedoch sind beim Hund eher die Vordergliedmaßen (Radius und Humerus) betroffen (Knecht und Priester, 1978; Withrow et al., 2013). Zudem scheinen größer gewachsene humane

Patienten, analog zu großen Hunderassen, ein gesteigertes Erkrankungsrisiko zu haben (Rosenberger et al., 2007; Mirabello et al., 2011).

3.2. Ätiologie

Wie beim kaninen Osteosarkom ist die exakte Ätiologie der humanen Form unbekannt. Es sind jedoch bestimmte Risikofaktoren bekannt, die Einfluss auf die Genese eines humanen Osteosarkoms nehmen können. Zu den potentiellen Induktoren zählen spezielle Chemikalien, wie Beryllium, oder das FBJ-Virus, benannt nach seinen Entdeckern Finkel, Biskis, and Jinkins (Yamagata und Yamagata, 1984; Fuchs und Pritchard, 2002). Gewisse Erkrankungen, wie das Li-Fraumeni-, Bloom- oder Rothmund-Thomson-Syndrom, werden im Zusammenhang mit Osteosarkomen genannt und deuten auf genetische Prädispositionen hin (Fuchs und Pritchard, 2002). Selten kann sich ein Osteosarkom im Narbengewebe nach Trauma oder Hitze- oder Säureeinwirkung entwickeln. Außerdem wird von neoplastischen Veränderungen an früheren Frakturlokalisationen in Nähe von Implantaten verschiedener Materialien berichtet (Aboulafia et al., 1999; Kirkpatrick et al., 2000).

Somit treten bereits bei den Ursachen viele Gemeinsamkeiten (Strahlung, Genetik und Trauma) mit dem kaninen Osteosarkom auf (Mueller et al., 2007).

3.3. Genetik

Die Genexpressionsmuster sind erstaunlich ähnlich bei kaninen und humanen Osteosarkomen (Withrow et al., 1991; Paoloni et al., 2009). Diese Analogien sind in Tabelle 4 in Kapitel 3.9. aufgelistet.

Des Weiteren finden sich Gemeinsamkeiten bei der Chromosomenlokalisierung (Phillips et al., 2010), Chromosomenaberrationen (Sandberg und Bridge, 2003; Thomas et al., 2009) und Onkogenen (Entz-Werle et al., 2007).

Die Identifikation abweichender Genexpression in kaninen Tumorgewebeproben trug zur Etablierung prognostischer Marker und innovativer Therapien in der Humanmedizin bei (Kleinerman et al., 1992; Asano und Kleinerman, 1993; Kleinerman et al., 1995; Scott et al., 2011).

3.4. Biologisches Verhalten

Zu den Gemeinsamkeiten des humanen und kaninen Osteosarkoms zählen die spontane, appendikuläre Primärtumorformation, die schnelle pulmonale Metastasierung (Haupttodesursache), die seltenen Lymphknotenmetastasen und eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit für nicht bzw. selten nachweisbare Mikrometastasen zum Diagnosezeitpunkt (Link et al., 1986; Ward und Hosseinian, 1994; Boerman et al., 2012; Farcas et al., 2014). Außerdem finden sich die größten Erkrankungszahlen bei großen Hunderassen und bei Kindern bzw. Jugendlichen. In beiden Fällen könnte rapides Knochenwachstum eine entscheidende Rolle spielen (Mirabello et al., 2009; Whelan et al., 2012; Botter et al., 2014).

Unterschiede finden sich bei der Überlebensrate; das kanine Osteosarkom zeichnet sich durch eine höhere Aggressivität und kürzere mediane Überlebenszeiten aus (Boston et al., 2006; Simcock et al., 2012). 65-75 % der humanen Patienten ohne Metastasen überleben 5 Jahre, im Gegensatz zu nur 20 % derjenigen mit einem metastasierten Osteosarkom (Harris et al., 1998; Bielack et al., 2002).

3.5. Klinik

Auch beim klinischen Verlauf finden sich viele Parallelen zwischen Mensch und Hund. Die Anamnese beinhaltet meist eine zunehmende Schmerzhaftigkeit und eine Schwellung der betroffenen Lokalisation, die oft zunächst für eine Lappalie gehalten bzw. einer anderweitigen Ätiologie zugeschrieben wird (Mueller et al., 2007). Bei Hunden beginnt die Lahmheit zunächst intermittierend und in geringgradiger Ausprägung (Morello et al., 2011). Beim Menschen tritt eine vermehrte Schmerzhaftigkeit vor allem im Zusammenhang mit Belastung und Schlafphasen auf (Messerschmitt et al., 2009; Ta et al., 2009). Palpatorisch findet sich bei Hund und Mensch eine harte und schmerzhaft Masse (Messerschmitt et al., 2009; Ta et al., 2009; Morello et al., 2011). Beim humanen Patienten wird in der Literatur zudem lokale Wärme und Erythembildung genannt (Messerschmitt et al., 2009; Ta et al., 2009). Zudem kommt die psychische Belastung beim menschlichen Patienten hinzu (Greenberg et al., 1994). Pathologische Frakturen können bei beiden Spezies vorkommen (Morello et al., 2011).

3.6. Diagnostik

Zunächst wird nach einer gründlichen Anamnese und orthopädischen Untersuchung sowohl beim humanen als auch kaninen Patienten röntgenologisch der betroffene Knochen evaluiert (Robert, 2000). Für eine definitive diagnostische Aussage wird in der Human- und Tiermedizin auf die Biopsie und histopathologische Bewertung zurückgegriffen (Powers et al., 1988; Barger et al., 2005; von Eisenhart-Rothe et al., 2011). Weitere bildgebende Verfahren, wie Ganzkörper-Scans, CT, MRT und PET-CT, kommen vor allem in der Humanmedizin zum Einsatz (Mueller et al., 2007).

Hämatologische Parameter können zusätzlich erhoben werden. Erhöhte ALP-Werte im Serum finden sich sowohl beim Hund (Ehrhart et al., 1998; Garzotto et al., 2000; Kirpensteijn et al., 2002a; Hillers et al., 2005; Moore et al., 2007) als auch dem Menschen (Grundmann et al., 1983).

3.7. Therapie

Der Goldstandard der Humanmedizin besteht aus der Kombination einer neoadjuvanten Chemotherapie, chirurgischer Primärtumorsektion und adjuvanter Chemotherapie (Mueller et al., 2007). Die kanine Osteosarkomtherapie hingegen schließt in den meisten Fällen die Kombination von Amputation der betroffenen Gliedmaße und einer adjuvanten Chemotherapie ein (Kessler und Ammer, 2013). Beim Menschen kommt als Chemotherapeutikum Methothrexat, Doxorubicin und Cisplatin zum Einsatz (Rainusso et al., 2013). Interessanterweise lässt sich ein vermehrtes Auftreten von Knochen- und Weichteilmetastasen nach Chemotherapie bei Hund und Mensch beobachten (Bacci et al., 1995; Berg et al., 1995).

L-MTP-PE ist auch für die Humanmedizin zugelassen und kann in Kombination mit einer Chemotherapie die Überlebenszeit signifikant verbessern (Meyers et al., 2008).

Die chirurgische Exzision pulmonaler Metastasen wird in der Humanmedizin standardmäßig durchgeführt (Downey, 1999) und führt zu verbesserten Überlebenszeiten von 21-30 % (Salah und Toubasi, 2015). Die chirurgische Metastasenentfernung in der Humanmedizin wird daher bereits beim Fund

einzelner Metastasen vorgenommen (Salah und Toubasi, 2015). Wie bereits in Kapitel 2.10.5. erwähnt, findet dieses Verfahren noch keine standardmäßige Anwendung in der Tiermedizin (Ogilvie et al., 1993).

Ein palliatives Management findet im Gegensatz zur kaninen Osteosarkomtherapie in der Humanmedizin kaum Anwendung. Dies ist auf die ausgeprägte Chemotherapieresistenz multipler Metastasen zurückzuführen. Im Falle eines unkontrollierbaren Primärtumorwachstums wird eher zu einer Amputation der entsprechenden Gliedmaße geraten (Mueller et al., 2007).

Die Strahlentherapie kommt in der Human- und Veterinärmedizin zum Einsatz und dient vornehmlich der Schmerzreduktion (McEntee, 1997). Des Weiteren wird sie beim Menschen zur Therapie von inoperablen oder unkontrollierbaren Tumoren eingesetzt (Mueller et al., 2007).

3.8. Prognose und Outcome

Als entscheidende und wichtigste prognostische Faktoren des humanen Osteosarkoms gelten der Metastasierungszeitpunkt und die Chemotherapiesensitivität. Eine zum Diagnosezeitpunkt bereits vorhandene Metastasierung geht verglichen mit einer späteren Metastasierung während oder nach chemotherapeutischer Intervention mit einer schlechteren Prognose einher (Harris et al., 1998; Bielack et al., 2002). Bestimmte humane metastasierte Osteosarkomzellen zeichnen sich durch totale Chemotherapieresistenz aus, welche somit einen kurativen Therapieansatz erschwert und die Prognose verschlechtert. Mittlerweile ist es aber möglich, eine derartige Resistenz anhand zellulärer Expressionsprofile nachzuweisen, um frühzeitig auf anderweitige Therapieoptionen ausweichen zu können (Weigelt et al., 2005).

Prognostisch am relevantesten für das kanine Osteosarkom sind analog zur humanen Form der Metastasierungsstatus und -zeitpunkt (Withrow et al., 2013), sowie die ALP-Blutwerte (Ehrhart et al., 1998), der histologische Tumograd (Kirpensteijn et al., 2002a) und die Ausprägung der Tumormikrovaskularisation (Coomber et al., 1998). Die Vaskularisation wurde mittels Immunhistologie von Primärtumoren untersucht, die auf von Willebrand Faktor angefärbt wurden (Gefäßendothel-Nachweis) (Coomber et al., 1998).

Hinsichtlich des Outcomes geht das kanine Osteosarkom mit einer höheren Aggressivität und somit kürzeren medianen Überlebenszeiten einher (Boston et al., 2006; Simcock et al., 2012). 65-75 % der humanen Patienten ohne Metastasen überleben 5 Jahre, jedoch nur 20 % derjenigen mit einem metastasierten Osteosarkom (Harris et al., 1998; Bielack et al., 2002).

Tabelle 4 beinhaltet eine vergleichende Übersicht der Eigenschaften des humanen und kaninen Osteosarkoms und zeigt die vielen Similaritäten auf.

Tabelle 4: Vergleichende Übersicht der Eigenschaften des kaninen und humanen Osteosarkoms modifiziert nach (Morello et al., 2011) und (Fenger et al., 2014)

Eigenschaft	Kanines OS	Humanes OS
Inzidenz	8000- >10000 pro Jahr	600-1000 pro Jahr
Erkrankungsalter	Mittelalt: 7-9 Jahre Selten: 18-24 Monate	Jung: 10-20 Jahre
Geschlechterverteilung	1,1-1,5 : 1 (m:w)	1,5-1,6 : 1 (m:w)
Ätiologie	<ul style="list-style-type: none"> - Größtenteils unbekannt - ionisierende Strahlung - Knocheninfarkt - chron. Osteomyelitis - metallische Implantate - Frakturtraumata 	<ul style="list-style-type: none"> - Größtenteils unbekannt - ionisierende Strahlung - Knocheninfarkt - chron. Osteomyelitis - metallische Implantate - Morbus Paget
Genetik	<ul style="list-style-type: none"> - p53 - IGF-1(-R) - HGF/c-Met - ErbB2/HER-2 - PTEN - Ezrin - Matrix-metalloproteinasen - PDGF-β - VEGF - P-gp 	<ul style="list-style-type: none"> - p53 - IGF-1(-R) - HGF/c-Met - ErbB2/HER-2 - PTEN - Ezrin - Matrix-metalloproteinasen - PDGF-β - VEGF - P-gp

Lokalisation	<ul style="list-style-type: none"> - 75 % appendikulär - Metaphysen langer Röhrenknochen - Dist. Radius > prox. Humerus > dist. Femur 	<ul style="list-style-type: none"> - 90 % appendikulär - Metaphysen langer Röhrenknochen - Dist. Femur > prox. Tibia > prox. Humerus
Klinik	<ul style="list-style-type: none"> - Schmerzhaftigkeit - Schwellung - harte, schmerzhafte Zubildung - selten pathologische Fraktur 	<ul style="list-style-type: none"> - Schmerzhaftigkeit - Schwellung - harte, schmerzhafte Zubildung - selten pathologische Fraktur
Histopathologie	95 % high grade	85-95 % high grade
Metastasierungslokalisation	Lunge > Knochen > Weichteilgewebe Regionale Lnn.: 4,4-9 %	Lunge > Knochen > Weichteilgewebe Regionale Lnn.: < 10 %
Vorhandene Metastasierung zum Zeitpunkt der Diagnose	10 % (Lunge, Knochen)	20 % (Lunge, Knochen)
Metastasierungsrate ohne Chemotherapie	90 % nach ≤ 1 Jahr	85-90 % nach ≤ 2 Jahren
Therapie	<ul style="list-style-type: none"> - v.a. Amputation - gliedmaßenerhaltende Chirurgie - adjuvante Chemotherapie 	(- Amputation) <ul style="list-style-type: none"> - gliedmaßenerhaltende Chirurgie (90 %) - neoadjuvante Chemotherapie
Prognose	60 % nach 1 Jahr mit Chemotherapie	70 % nach 5 Jahren mit Chemotherapie
Negative prognostische Faktoren	<ul style="list-style-type: none"> - appendikuläre axiale Lokalisation - OS am prox. Humerus - Metastasen zum Diagnosezeitpunkt - großer Tumor - Rezidiv - erhöhte ALP - erhöhte LDH - Tumorgrad 	<ul style="list-style-type: none"> - appendikuläre axiale Lokalisation - OS am prox. Humerus, Becken - Metastasen zum Diagnosezeitpunkt - großer Tumor - Rezidiv - erhöhte ALP - erhöhte LDH - Tumorgrad

	<ul style="list-style-type: none"> - junges Alter - mikrovaskuläre Dichte intratumoral 	<ul style="list-style-type: none"> - sehr junges Alter - schlechtes Ansprechen auf neoadjuvante Chemotherapie: % Tumornekrose - mikrovaskuläre Dichte intratumoral
Positive prognostische Faktoren	<ul style="list-style-type: none"> - Chemotherapie - postoperative Infektion - hoher Prozentsatz Tumornekrose nach Chemo- o. Radiotherapie -Mandibula 	<ul style="list-style-type: none"> - Chemotherapie - postoperative Infektion - hoher Prozentsatz Tumornekrose nach Chemo- o. Radiotherapie -Mandibula

Rot markiert Unterschiede, grün Gemeinsamkeiten und orange Ähnlichkeiten. ALP= Alkalische Phosphatase, LDH= Laktatdehydrogenase, Lnn.= Lymphonodi, m=männlich, OS=Osteosarkom, w=weiblich.

3.9. Fazit und Bedeutung für die Osteosarkom-Forschung

Die Gegenüberstellung der Merkmale dieser Neoplasie bei Mensch und Hund macht die große Ähnlichkeit sehr deutlich (Tabelle 4). Lediglich bei der Inzidenz, dem wahrscheinlichsten Erkrankungsalter, der Metastasierungsrate ohne Chemotherapie und der Prognose finden sich große Unterschiede.

Diese große Similarität macht die kanine Spezies zu einem nahezu optimalen Tiermodell für die humane Osteosarkomforschung hinsichtlich Tumorbiologie und Entwicklung neuer Therapien (Vail und Macewen, 2000; Sutter und Ostrander, 2004).

Weitere Vorteile des Hundes bestehen in der größeren genetischen Ähnlichkeit verglichen mit Mäusen, den klassischen Versuchstieren (Kirkness et al., 2003; Switonski et al., 2004). Ein zusätzlicher Pluspunkt gegenüber der murinen Spezies stellt die ausgezüchtete Hundepopulation (Maus: Inzucht) und ein spontan auftretendes Osteosarkom dar (Maus: induziertes Osteosarkom). Zudem leben Hund und Mensch meist in Gemeinschaft und sind somit vergleichbaren Umweltrisiken ausgesetzt (Mueller et al., 2007). Eine höhere Erkrankungswahrscheinlichkeit als beim Menschen, weniger bindende Therapieempfehlungen und geringere Kosten für klinische Studien vergrößern den Vorteil des Hundes als Tiermodell der Osteosarkomforschung (Withrow et al.,

1991; Mueller et al., 2007). Da klinische Studien an Menschen nur bei den Patienten durchgeführt werden dürfen, die bereits Metastasen entwickelt haben und mit toxischen Nebenwirkungen der Chemotherapeutika zu kämpfen haben (Rankin et al., 2012), könnte der Hund als Tiermodell für die zuvor stattfindenden Krankheitsphasen eingesetzt werden. Am Anfang jeder *in vivo*-Forschung steht aber zunächst das NagermodeLL, in diesem Fall die Maus.

Bevor der Hund als Tiermodell herangezogen wird, sollten die Homo- und Heterogenitäten dieser Erkrankung bei Mensch und Hund weiter erforscht werden, um die Grenzen und Möglichkeiten des kaninen Tiermodells voll ausschöpfen zu können (Mueller et al., 2007). Die Behandlung dieser Hunde erfolgt ebenfalls in kurativer Intention und kann zur Erforschung neuer Therapiekonzepte und Medikamente beitragen, wovon beide Spezies profitieren würden (Botter et al., 2014).

4. *In vivo*-Osteosarkom-Forschung

4.1. Anfänge der *in vivo*-Osteosarkom-Forschung

Bereits in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde von Forschern wie Sabin und Brunschwig der karzinogene Effekt radioaktiver und chemischer Substanzen entdeckt. Das Osteosarkom ließ sich dabei durch hohe radioaktive Dosen *de novo* bei Mäusen und Kaninchen induzieren (Sabin et al., 1932; Brunschwig, 1938; Taylor et al., 1985; Cherrier et al., 2005). Auch im Rattenmodell konnte nach ³²P-Orthophosphat-Applikation eine hohe Inzidenz von Osteosarkomerkrankungen beobachtet werden (Bensted et al., 1961; Martin et al., 1976). Diese strahlungs- und chemisch-induzierten Modelle wurden bis in die 70er Jahre des 20. Jahrhunderts standardmäßig verwendet (Cobb, 1970). Trotz einiger Ähnlichkeiten zu spontan auftretenden Osteosarkomen (Rosemann et al., 2002), fällt die Reproduzierbarkeit aufgrund eines langsamen und unvorhersehbaren Wachstums sehr gering aus (Botter et al., 2014). Weitere Nachteile sind teilweise unerwartete Tumorlokalisationen (Ellender, 2001) und die aufgrund des zugrunde liegenden mutagenen Prozesses fehlende Identifikationsmöglichkeit hoch exprimierter Gene (Botter et al., 2014). Die Hauptproblematik liegt jedoch darin, dass der Großteil der humanen und kaninen Osteosarkome spontan auftritt und nur ein kleiner Anteil strahlungsinduziert ist (Kansara et al., 2009). Daher ist die Aussagekraft dieser Modelle für die humane und kanine Osteosarkomforschung begrenzt (Janeway und Walkley, 2010). Jedoch steht am Anfang jeder *in vivo*-Anwendung das Nagerrmodell, klassischerweise die Maus.

4.1. Eigenschaften eines Osteosarkom-Modells

Die Aussagekraft eines Osteosarkom-Modells ist von vielen Bedingungen abhängig, um der Pathophysiologie des tatsächlichen Tumors möglichst nahe zu kommen.

Zunächst einmal hat der Tumorzellursprung und die Spezies des Empfängerorganismus eine entscheidende Bedeutung für die Relevanz des Modells. Hierbei wird zwischen xenogenetisch (unterschiedliche Spezies), syngenetisch (dieselbe Spezies, genetisch identisch) und allogenetisch (dieselbe Spezies, genetisch nicht identisch) unterschieden. Am häufigsten finden in der

Osteosarkom-Forschung xenogenetische (z.B. humane Zellen in immunsupprimierten Mäusen) und syngenetische Modelle (z.B. murine Zellen in immunkompetenten Mäusen, K7M2) Anwendung.

Des Weiteren spielt Art und Ort der Tumorzellimplantation eine entscheidende Rolle. Es besteht die Möglichkeit, eine Zellsuspension oder ein kleines Tumorgewebsstück orthotopisch (an Ort und Stelle der natürlichen Tumorentstehung) oder ektopisch (außerhalb) zu implantieren. Beispielsweise sind hier im Osteosarkom-Zusammenhang die intratibiale Injektion (orthotopisch) und die subkutane Implantation (ektopisch) zu nennen (Botter et al., 2014). In diesem Zusammenhang wurde nach subkutanen Implantationen von abweichenden Primärtumorgrößen und Metastasenzahlen im Vergleich mit intratibialen Injektionen berichtet. Die Expression des Osteosarkom-Markers Ezrin fiel im Vergleich ebenfalls höher aus (Jaroensong et al., 2012). Die Umgebung der Tumorzellen scheint somit eine entscheidende Rolle für den weiteren Verlauf der Erkrankung zuzukommen.

Im Anschluss an die Tumorgenese liegt besonderes Augenmerk auf den Tumorgewebeeigenschaften und dem Metastasierungsverhalten. Wünschenswert sind hier eine schnelle Entwicklung des Primärtumors und der Metastasierung (Botter et al., 2014).

Optimale Eigenschaft eines Osteosarkom-Modells wäre zu allererst ein spontan auftretendes Osteosarkom im Tiermodell. Bei Mäusen kommt dies nur sehr selten vor (Dunn und Andervont, 1963; Frith et al., 1982; Kavirayani et al., 2011), sodass Forscher oft auf genetisch veränderte, für Knochensarkome prädestinierte Mausstämme, zurückgreifen. Allerdings ist das Verwenden dieser Stämme mit langen Züchtungsprotokollen verbunden und somit nicht optimal (Botter et al., 2014).

Weitere ideale Eigenschaften wären eine orthotopische Lokalisation des Primärtumors und eine spontane, hauptsächlich pulmonale Metastasierung. Das Tumorstroma sollte dem der humanen/kaninen Neoplasie möglichst ähnlich sein (osteoblastisch, chondroblastisch oder fibroblastisch) (Botter et al., 2014). Die Expression bekannter Osteosarkom-Marker, wie ALP, COL, OPN, MGP und OCN

wären weitere wünschenswerte Parameter (Zhou et al., 1994).

Zusätzliche hilfreiche Charakteristika wären eine ausgeprägte Kenntnis über pathophysiologische Mechanismen, eine hohe Reproduzierbarkeit, Vorhersehbarkeit und Homogenität des Modells (Sampson et al., 2013a; Sampson et al., 2013b; Botter et al., 2014). Ziel dieses möglichst realistischen Modells sind die Erforschung der Tumorbilogie und –genetik, der bisher weitgehend unbekannten Ätiologie und der Wirksamkeit innovativer therapeutischer Ansätze (Ek et al., 2006).

4.2. Entwicklung und Geschichte der murinen K7M2-Zelllinie

Die K7M2-Zelllinie geht zurück auf K7- und K12-Zellen, die in den 80er Jahren aus einem spontan auftretenden Osteosarkom des distalen Femurs einer alten weiblichen balb/c Maus isoliert wurden (Schmidt et al., 1988). Die Etablierung der K7M2-Zelllinie erfolgte danach durch mehrere Zyklen von Tumorzellisolation aus pulmonalen Metastasen und anschließender Implantation der gewonnenen Zellen in einen paraostealen tibialen Muskel-Flap bei Mäusen (Khanna et al., 2000; Khanna et al., 2001).

Zunächst wurden 2-4 mm große Tumorfragmente, die zuvor intramuskulär in Donortieren gewachsen waren, in balb/c-Maustibiae implantiert. Um den Metastasierungsprozess weiter untersuchen zu können, war es erforderlich die betroffene Gliedmaße zu amputieren, bevor der Primärtumor zum Tode führen konnte. Mit Hilfe dieses Modells wurde später auch der Osteosarkommetastasen-Marker Ezrin entdeckt (Khanna et al., 2004).

4.3. Eigenschaften der K7M2-Zelllinie

Beim Vergleich mit der ursprünglichen K12-Linie fiel die wesentlich höhere Aggressivität der entstandenen K7M2-Zelllinie auf. Der Implantationsort spielte ebenfalls eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit und Geschwindigkeit des Tumorwachstums. Zusätzlich fanden sich bei orthotopischer Gewebsfragmentimplantation ein einheitlicheres Primärtumorwachstum und 30 % mehr pulmonale Metastasen im Vergleich zu Zellinjektionen. Drei bis vier Wochen posttransplantativ erreichten die Tumore ein Volumen von ca. 450 mm³. Hinsichtlich Tumorproliferation und –apoptose fanden sich keine Unterschiede

zwischen den beiden Zelllinien. Die Evaluation der Tumorangiogenese mit CD31- und Faktor VIII-Immunfärbung zeigte jedoch höhere Werte bei Primärtumoren und Metastasen der K7M2-Linie (Khanna et al., 2000).

cDNA Microarray-Untersuchungen offenbarten die Hochregulation vieler wichtiger Zellmotilitäts-, Adhäsions- und Angiogenesegene bei der K7M2- Zelllinie, wie Integrin $\beta 4$, Ezrin, Clusterin, Decorin und Ceruloplasmin (Khanna et al., 2001).

In Kombination sind die K7M2- und K12-Zelllinie dank ihrer unterschiedlichen Charakteristika sehr gut geeignet für die Erforschung neuer Strategien gegen sich sehr heterogen verhaltende humane Osteosarkome (Ek et al., 2006). Diese Heterogenität hat dann allerdings eine Senkung der Reproduzierbarkeit zur Folge (Botter et al., 2014).

4.4. Neue Entwicklungen und Ausblick

(Kim et al., 2008) entwickelten auf Grundlage der K7M2-Zelllinie die K7M3-Luziferase, die es ermöglicht, Metastasierung und Beteiligung eines Chemokinrezeptor-Signalling zu untersuchen. Allerdings führt die Implantation dieser Zelllinie zu verringerten Metastasenzahlen und ist somit eher für die Evaluation experimenteller Metastasen geeignet (Fan, 2010).

Langzeit-Anwendungen von 1-34 Parathyroid Hormon führten bei Ratten zu einer hohen Wahrscheinlichkeit ein metastatisches Osteosarkom zu entwickeln (Tashjian und Goltzman, 2008).

Gewebeuntersuchungen (wie die Genexpressionsanalyse) kaniner Osteosarkome haben gezeigt, dass sie einige biologische Eigenschaften mit der humanen Neoplasie teilen, wie bereits in Kapitel 3 erläutert (Mueller et al., 2007; Paoloni et al., 2009). Dies stellt eine großartige Möglichkeit dar, vergleichbare onkologische Studien und die Etablierung innovativer Therapiekonzepte durchzuführen (Janeway und Walkley, 2010).

Um dieser Erkrankung mit neuen Therapieansätzen begegnen zu können, bedarf es eines verbesserten Verständnisses der Genetik von Entstehung, Progression und Metastasierung. Durch Isolation von Primärtumor- und Metastasenzellen könnten Bibliotheken aufgebaut werden, die dann Screenings unterzogen würden, um entsprechende genetische Interaktionen, Signalkaskaden und

potentielle Ansatzpunkte für neue Therapeutika zu identifizieren (Janeway und Walkley, 2010).

Weitere Untersuchungen sind nötig, um den Progenitor-Zelltyp zu identifizieren, von der die Entstehung des Osteosarkoms ausgeht (Janeway und Walkley, 2010). Das systematische Analysieren der Gendeletion in der Entwicklung vom primitivsten Zelltyp, der multipotenten Stammzelle, zum adulten Osteoblasten könnte weiteren Aufschluss geben (Janeway und Walkley, 2010).

5. Das aromatische Kohlenwasserstoff-Amphiphil (N-(fluorenylmethoxycarbonyl)-glucosamin-6-phosphat)

5.1. Allgemeine Eigenschaften des aromatischen Kohlenwasserstoff-Amphiphils

Kohlenwasserstoffe gehören zu den am häufigsten vorkommenden Biomolekülen (Varki et al., 2009; Pashkuleva und Reis, 2010). Aufgrund der hohen Anzahl an Hydroxylgruppen besitzen sie die Eigenschaft hochhydrierte Gele zu bilden. Viele Gewebe, wie z.B. Knorpel, enthalten viele dieser Kohlenwasserstoffe (Mansour, 2003) und erfüllen somit ihre ganz spezifische Funktion. Diese Vielfalt an chemischen Eigenschaften, die Fähigkeit zur Gelierung und ihre zentrale Rolle im Metabolismus eröffnet zahlreiche medizinische Anwendungsmöglichkeiten (Pires et al., 2015).

Aromaten, aromatische Verbindungen oder Arene sind der organischen Chemie zuzuordnen und stellen hier eine wichtige Verbindungsklasse dar. Charakteristisch ist die planare, Zyklische Struktur mit konjugierten Doppelbindungen und das günstige Energieniveau unter Erfüllung der Aromatizitätskriterien (Maier, 1975).

Amphiphilie beschreibt die Eigenschaft eines Moleküls, gleichzeitig hydrophobe und hydrophile Anteile zu besitzen (Berg et al., 2015).

5.2. Funktionsprinzip des aromatischen Kohlenwasserstoff-Amphiphils

Das zu testende aromatische Kohlenwasserstoff-Amphiphil (N-(fluorenylmethoxycarbonyl)-glucosamine-6-phosphate), abgekürzt aKA, besitzt unter enzymatischer Dephosphorylation die Fähigkeit zur Selbstassemblierung in Nanofäden (Pires et al., 2015). Ein Trigger für diese Selbstassemblierung ist das Enzym Alkalische Phosphatase (ALP), welches u.a. in etablierten Osteosarkom-Zellen (SaOs2) überexprimiert wird (Pautke et al., 2004). Dieser Vorgang ist in Abbildung 3 dargestellt.

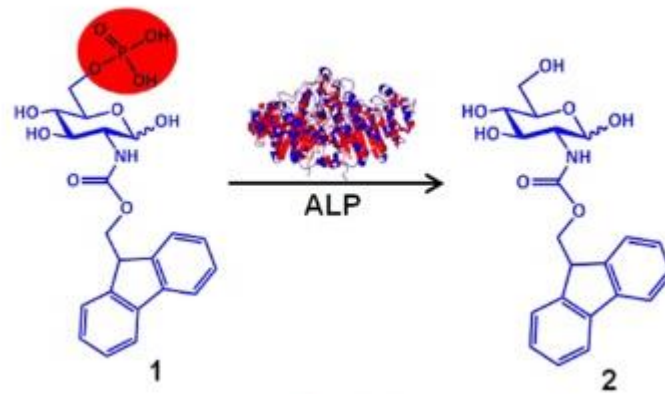


Abbildung 3: Enzymatische Transformation von Form 1 in Form 2 in ALP-Gegenwart aus (Pires, Abul-Haija et al. 2015).

Im Rahmen dieser Selbstassemblierung kommt es zur Gelierung des aKA auf der Zelloberfläche, was innerhalb der ersten 7 Stunden zu einer verminderten metabolischen Aktivität der Osteosarkomzellen führt. Bei längeren Expositionszeiten über 24 Stunden resultiert dieser „Hydrogel-Käfig“ um die Tumorzellen in der Apoptose (Abbildung 4). Dieser Mechanismus ist spezifisch für ALP-produzierende Zellen, die metabolische Aktivität nicht-ALP produzierender Zellen wird von aromatischen Kohlenwasserstoff-Amphiphilen nicht beeinflusst.

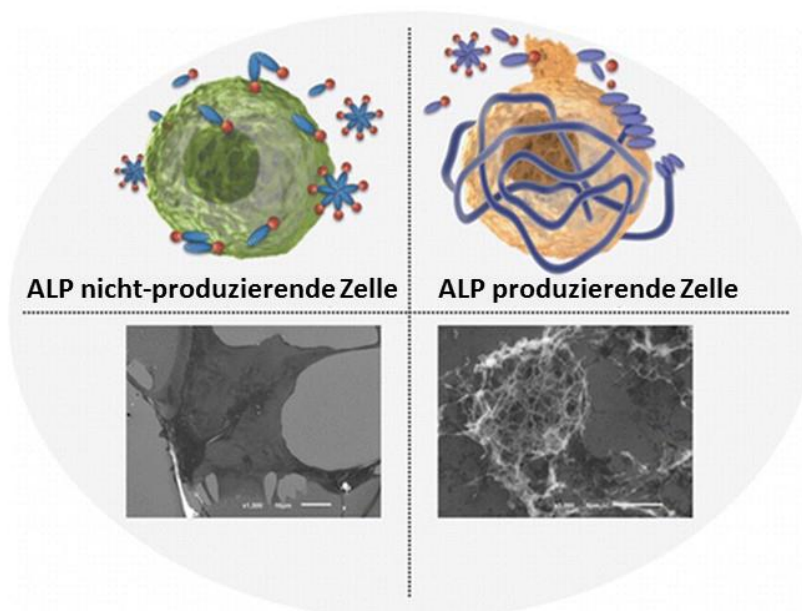


Abbildung 4: Funktionsprinzip des aKA aus (Pires, Abul-Haija et al. 2015). Zellen ohne ALP-Produktion zeigen physiologische Morphologie, während ALP-produzierende Zellen apoptotisch werden.

Entsprechende Experimente (Abbildung 5) wurden von Pires et al. durchgeführt: ATDC5, eine Prächondrozyten-Zelllinie mit geringer ALP-Expression, wies bei Kontakt mit dem aKA keine Beeinflussung der metabolischen Aktivität auf. Des Weiteren wurde durch die Zugabe eines Phosphatase-Inhibitors der direkte Zusammenhang zwischen ALP-Aktivität und Zytotoxizität des aKA auf die Osteosarkomzelllinie SaOs2 nachgewiesen (Pires et al., 2015).

Die zielgerichtete Wirkung auf Osteosarkomzellen bei Schonung anderer Zelltypen macht das aKA zu einem sehr eleganten und innovativen Tool der onkologischen Forschung.

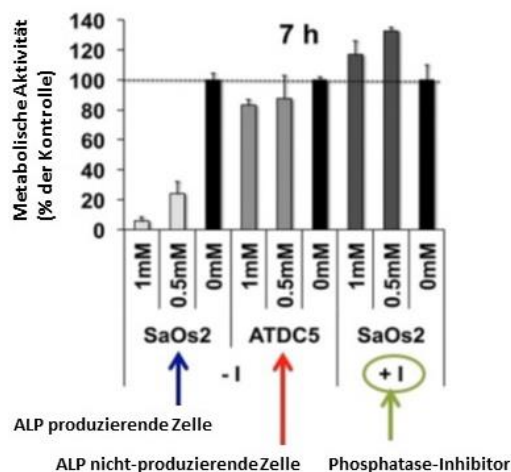


Abbildung 5: *In vitro*-Versuche mit unbehandelten Osteosarkomzellen (SaOs2), Prächondrozyten (ATDC5) und Osteosarkomzellen in Kombination mit Phosphatase-Inhibitor aus (Pires, Abul-Haija et al. 2015). ALP=Alkalische Phosphatase.

5.3. Alkalische Phosphatase

Die Enzymfamilie der Alkalischen Phosphatase, kommt annähernd ubiquitär in den meisten Körperflüssigkeiten und Geweben vor und setzt sich aus 7 verschiedenen Isoformen zusammen. Diese Isoenzyme unterscheiden sich in ihren Eigenschaften, besitzen aber dennoch Überlappungen bei der Substratspezifität. Chemisch sind sie den Glykoproteinen zuzuordnen und ihre Funktion besteht in der Hydrolyse zahlreicher natürlicher und synthetischer Phosphatester im optimalerweise alkalischen Milieu (pH 9-10). Die vier Genloci der Alkalische Phosphatase finden

sich auf zwei unterschiedlichen Chromosomen. Abbildung 6 gibt einen Überblick über die Genloci und Isoformen der Alkalischen Phosphatase. Posttranslationale Modifikationen ermöglichen das Vorkommen der sieben Isoenzyme: Die gewebsunspezifische ALP in Leber, Knochen, Niere und Erst-Trimesterplazenta, sowie die gewebspezifische Dritt-Trimesterplazenta- und Intestinum-ALP, sowie eine weitere intestinale und fetale intestinale ALP (Harris, 1990; Gressner und Arndt, 2013).

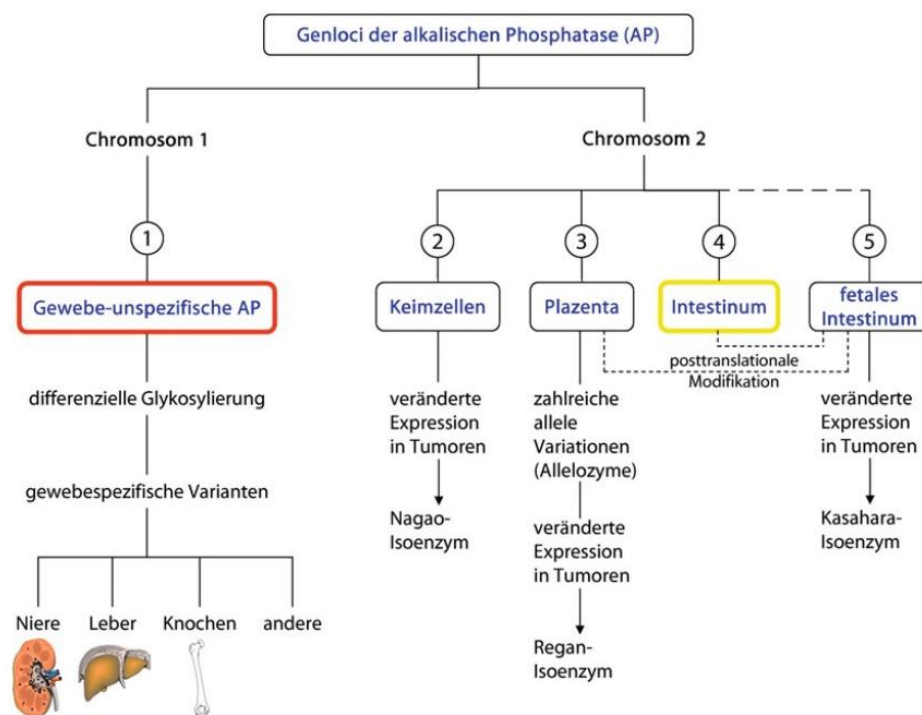


Abbildung 6: Genloci und Isoformen der Alkalischen Phosphatase (AP) aus (Gressner und Arndt 2013)

Nachzuweisen ist die ALP in den meisten Körperflüssigkeiten wie Serum, Lymphe, Galle und Urin. Zellen mit besonders hoher Aktivität sind Hepatozyten und Gallengangsepithelien, Osteoblasten, intestinale Mukosa-Mikrovilli, Plazentazellen, proximale Tubuluszellen und Leukozyten. Alle physiologischen Funktionen sind bisher nicht bekannt, jedoch wird die Beteiligung bei der Knochenkalzifikation, Sekretionsregulation des Gallengangepithels, Lipidresorption und -transport im Dünndarm und bei Endotoxinentgiftung z.B. im Rahmen einer Sepsis durch Phosphathydrolyse vermutet. Physiologischerweise lassen sich vor allem Leber- und Knochen-ALP nachweisen, die Zusammensetzung

schwankt aber altersabhängig. In der Kindheit und Adoleszenz sind die Knochen-ALP-Werte aufgrund des gesteigerten Knochenwachstums erhöht. Während der Gravidität und nach lipidreicher Nahrung steigt die ALP-Aktivität ebenfalls an. Zusätzliche Isoenzyme, wie das Nagao-, Regan- und Kasahara-Isoenzym können von neoplastischen Zubildungen ektopisch gebildet werden und dienen als Tumormarker (Harris, 1990; Gressner und Arndt, 2013).

Weitere diagnostische Maßnahmen beinhalten das Bestimmen der ALP-Isoenzyme oder anderer Laborwerte (Gressner und Arndt, 2013). In der Blutzirkulation beträgt die Halbwertszeit der ALP zwischen drei und sieben Tagen, die Eliminierung der Isoenzyme durch Hepatozyten geht unterschiedlich schnell vonstatten (Gressner und Arndt, 2013). Als hauptsächliches Untersuchungsmaterial wird Serum und Heparin-Plasma verwendet. Als Methode zur Aktivitätsbestimmung hat sich die Hydrolyse von farblosem 4-Nitrophenylphosphat zu gelbem 4-Nitrophenol und Phosphat etabliert. Dieser Farbumschlag wird dann kolorimetrisch bei 405 nm gemessen und ist proportional zur ALP-Aktivität (Schumann et al., 2011; Gressner und Arndt, 2013).

Die vielen *in vivo* stattfindenden Phosphorylations- und Dephosphorylationsreaktionen machen die ALP interessant für Anwendungen im Kampf gegen Krankheiten wie das Osteosarkom (Pires et al., 2015).

6. Der Metabolit Sauerstoff und seine Rolle im neoplastischen Zusammenhang

Sauerstoff ist aufgrund seiner Beteiligung an diversen grundlegenden Zellprozessen einer der essentiellsten Metaboliten. Zum Einen ist Sauerstoff das Hauptsubstrat des aeroben Stoffwechsels. Zweitens sind viele Enzyme auf Sauerstoff angewiesen, hier seien beispielsweise solche genannt, die an der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung und der Adenosintriphosphat (ATP)-Produktion beteiligt sind (Wiesener und Maxwell, 2003). Des Weiteren ist Sauerstoff essentiell für die Kollagensynthese, indem es die Hydroxylierung von Lysin und Prolin katalysiert (Giaccia et al., 2003). Eine entscheidende Rolle spielt Sauerstoff außerdem durch die Kontrolle eines spezifischen Genprogramms im Rahmen der Gewebeentwicklung und -homöostase (Maes et al., 2012). Ein wichtiges Beispiel, gerade im neoplastischen Zusammenhang, stellt die Regulation von Angiogenese-Genen durch den Hypoxie induzierbarer Faktor (HIF)-Signalweg dar (Kaelin, 2002). Dieser Signalweg wird in Kapitel 6.1.1 ausführlicher besprochen. Entsprechende *in vitro*-Experimente bestätigen signifikante Auswirkungen der Sauerstoffwerte auf die Proliferation skelettassoziiierter Zellen wie Osteoblasten, Osteoklasten und Chondrozyten (Lu et al., 2013).

6.1. Bedeutung von Sauerstoff für Neoplasien

Das neoplastische Wachstum ist gekennzeichnet durch die Gompertz-Wachstumskinetik (Abbildung 7), bestehend aus einem zunächst pseudoexponentiellen Wachstum und dem darauffolgenden Abflachen der Kurve bis zum Erreichen des Plateauwerts (DeVita Jr et al., 1997).

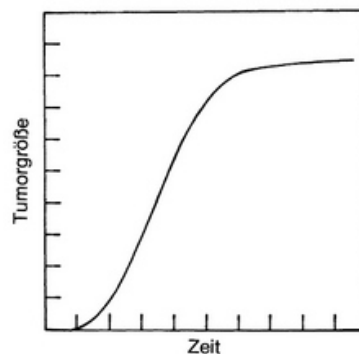


Abbildung 7: Wachstumskinetik von Tumoren nach Gompertz aus (Holdener, 1985)

Dieses Abflachen der Wachstumskurve hängt u.a. mit der häufig bei Tumoren auftretenden Tumorhypoxie zusammen. Diese resultiert aus der zunächst unkontrolliert exponentiellen Wachstumsgeschwindigkeit neoplastischer Zellen. Bereiche des Tumors, die zu weit von einem Blutgefäß entfernt sind (d.h. $> 150 \mu\text{m}$ Diffusionsstrecke bzw. $1\text{-}2 \text{ mm}^3$ Diffusionsvolumen), sind in Folge mit Sauerstoff unterversorgt und werden hypoxisch (Folkman, 1990; Hockel und Vaupel, 2001). Per Definition liegt eine Hypoxie vor, wenn der Sauerstoffverbrauch die Sauerstoffversorgung übersteigt. Die Sauerstoffsättigung von physiologischem Gewebe beträgt $40\text{--}60 \text{ mmHg}$, im Vergleich weisen 90 % der soliden Tumoren mediane Sauerstoffwerte von $< 40 \text{ mmHg}$, 50 % $< 10 \text{ mmHg}$ und 30 % $< 2,5 \text{ mmHg}$ auf (Oehler, 2014). Das Phänomen der Tumorhypoxie tritt bei soliden Tumoren, wie z.B. Kolon-, Mamma-, Magen-, Lungen-, Haut-, Ovarial-, Pankreas-, Prostata- und Nierenkarzinomen gehäuft auf (Zhong et al., 1999).

Im Folgenden führt die intratumorale Hypoxie durch Proliferationsinhibition (Stopp in G1/S-Phase des Zellzyklus) und Apoptoseinduktion zunächst zur Wachstumsbeeinträchtigung (Vaupel et al., 2004). Allerdings resultieren diese erschwerten Bedingungen in der Selektion von Tumorzellen, die an die hypoxischen Umstände angepasst und zur Proliferation unter anaeroben Bedingungen fähig sind (Welsh et al., 1996). Eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53 könnte zur Apoptoseresistenz führen und sich somit unter dem Selektionsdruck durchsetzen (Hockel und Vaupel, 2001; Weinmann et al., 2002). Untersuchungen haben außerdem ergeben, dass hypoxische Kulturkonditionen die Mutations- und Metastasierungswahrscheinlichkeit bei Zellen erhöht (Reynolds et al., 1996; Cairns et al., 2001; Cairns und Hill, 2004). Dabei weisen die entstandenen Mutationen erstaunliche Similaritäten mit Tumormutationen auf. Ursächlich könnten die bei alternierenden hyp- und normoxischen Bedingungen entstehenden Superoxide und Sauerstoffradikale sein (Reynolds et al., 1996; Vaupel, 2004). Zusätzlich zeigen Tumoren eine Präferenz für die anaerobe Glykolyse und metabolisieren Glukose zu Laktat, was direkte Auswirkungen auf den intratumoralen pH-Wert (5,6-7,6) hat. Dieses Phänomen wird als Warbureffekt bezeichnet (Molls et al., 1998b; Vaupel, 2004). Der niedrige pH-Wert hat einen immunsupprimierenden Effekt und erleichtert die

Tumorausdehnung und Gefäßinvasion (Sloane et al., 1990; Rozhin et al., 1994; Lardner, 2001). Da diese Art der Energiegewinnung (2 Moleküle ATP pro Glukosemolekül) wesentlich ineffizienter als die oxidative Phosphorylierung (38 Moleküle ATP pro Glukosemolekül) ist, bedarf es einer weitaus höheren Glukosemenge, um den hohen Bedarf zu decken (Berg et al., 2015).

Auch nach Induktion der Angiogenese ist eine optimale neoplastische Sauerstoffversorgung nicht unbedingt gewährleistet. Dies ist auf eine abweichende Gefäßarchitektur (ungleichmäßige Verteilung, maximal einschichtiges Endothel, hohe Permeabilität, keine Muskelschicht und Innervation, nur wenige Rezeptoren, keine Autoregulation) und ein nonfunktionales Lymphgefäßsystem zurückzuführen. Ein stetig wechselnder und insuffizienter intratumoraler Blutfluss in Kombination mit dem schnellen Metabolismus führen zu einer andauernden Unterversorgung mit O₂ und anderen Nährstoffen (Endrich und Vaupel, 1998; Molls et al., 1998b; Vaupel, 2004).

6.1.1. HIF-1-Signalweg

Anpassungsreaktionen an hypoxische Konditionen werden vor allem durch den Hypoxie induzierbaren Faktor-1 (HIF-1) vermittelt (Semenza und Wang, 1992). Zu diesen Adaptationsreaktionen zählen u.a. alternative Wege der ATP-Gewinnung (Glykolyse mit nachfolgender Laktatentstehung statt Zitratzyklus), Neoangiogenese, autonome Zellproliferation und Apoptoseinhibition (Harris, 2002).

Reguliert wird die Aktivität des Transkriptionsfaktors HIF-1 vor allem posttranslationell über die Stabilität der Untereinheit HIF-1 α (Frede et al., 2007). Normoxie führt zu sehr kurzen Halbwertszeiten des HIF-1 α , da es aufgrund sauerstoffabhängiger Prozesse durch das von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressorproteins stetig abgebaut wird (Maxwell et al., 1999; Jewell et al., 2001). Herrschen jedoch hypoxische Sauerstoffverhältnisse, erfolgt eine Inhibition der Abbauvorgänge und daraus resultiert eine Stabilisierung und Akkumulation der HIF-1 α -Untereinheit, sowie einer Transaktivierung von HIF-1-Zielgenen (Jiang et al., 1996; Weidemann und Johnson, 2008). Diese Aktivierung von Zielgenen dienen zwei übergeordneten Überlebensstrategien: Erstens eine Verbesserung

der Sauerstoffversorgung durch Ausschüttung von regulatorischen Molekülen der Angiogenese (wie VEGF-A), der Erythrozytenproduktion (Erythropoietin), des vasaer Druckverhältnisse (wie Hämoxxygenase-1) und des Eisenstoffwechsels (wie Transferrin) (Harris, 2002; Semenza, 2003). Die Initiierung der Angiogenese ermöglicht im zweiten Schritt durch Anschluss an das vaskuläre System die Metastasierung in weiter entfernte Organe (Folkman, 1990). Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) wird in der Literatur als ein entscheidendes Zytokin für Osteosarkomentwicklung und –metastasierung angegeben (Dvorak, 2002; Quan und Choong, 2006). Die zweite Überlebensstrategie stellen Adaptationsvorgänge an die hypoxischen Konditionen dar. Da für die weniger effiziente anaerobe Energieproduktion mehr Glukose benötigt wird, erfolgt eine erhöhte Expression der Glukosetransporter-1 und -3 (GLUT-1 und -3) sowie glykolytischer Enzyme (wie Hexokinase-1 und -2) (Denko, 2008). Auch Zellproliferation, -apoptose, -migration und -invasion im Rahmen der Metastasierung und der pH-Wert (reguliert durch u.a. Carboanhydrase 9) unterliegen dem regulatorischen Einfluss HIF-1 induzierter Gene (Harris, 2002). Eine Übersicht gibt Abbildung 8.

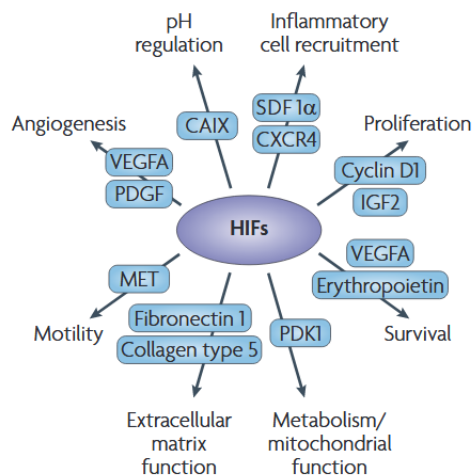


Abbildung 8: HIF und seine Zielgene aus (Bertout et al., 2008)

6.2. Einfluss der Tumorhypoxie auf Chemo- und Strahlentherapieeffizienz

Der Großteil der neoplastischen Therapien basiert auf einer DNA-Schädigung der Tumorzellen und der daraus resultierenden Apoptose (Debatin et al., 2002; Weaver und Cleveland, 2005). Wie bereits in Kapitel 6.1. beschrieben, sind neoplastische Zellen unter hypoxischen Bedingungen in der Lage ihre Zellproliferation zu arretieren (Vaupel, 2004). Somit wird der Angriffspunkt der auf DNA-Schädigung basierenden Therapien umgangen (Thomann, 2016). Aus diesem Grund ist bei hypoxischen Tumorzellen für denselben Effekt eine doppelt bis dreifache Bestrahlungsdosis im Vergleich zu normoxischen Zellen notwendig (Kumar, 2000). Die übliche Fraktionierung der Bestrahlungsdosis ermöglicht die Schonung des gesunden Gewebes, eine höhere Dosis für den Tumor und die Reoxygenierung der Tumorzellen. Letzere soll die Strahlenempfindlichkeit der Neoplasie und somit den Therapieerfolg steigern (Withers, 1975; Ward, 1988; Teicher, 1995). Der Sauerstoffpartialdruck gilt zudem als wichtiger prognostischer Faktor hinsichtlich des Therapieansprechens einer Strahlentherapie (Höckel et al., 1996; Okunieff et al., 1996; Dietz et al., 1999). Ohne Sauerstoff findet keine bzw. eine zu geringe Radikalbildung und –stabilisierung zur DNA-Schädigung der Tumorzellen statt (Molls et al., 1998a; Hall und Giaccia, 2006).

Einer ähnlichen Abhängigkeit von Sauerstoff unterliegen auch bestimmte Chemotherapeutika, wie z.B. Doxorubicin oder Carboplatin (Teicher et al., 1981; Teicher, 1994; Teicher, 1995). Der zunächst vorherrschende Mangel und die später ungleichmäßig ausgebildete abnormale Vaskulatur führen im Folgenden zur eingeschränkten Verfügbarkeit des Chemotherapeutikums (Minchinton und Tannock, 2006). Mit zunehmender Tumorgröße nimmt die Anzahl hypoxischer Tumorareale inklusive Nährstoffmangel und Abnahme des pH-Werts zu (Harris, 2002; Minchinton und Tannock, 2006). Das heißt je größer der Tumor, desto kleiner fällt die Empfindlichkeit gegenüber einer Chemotherapie aus (DeVita Jr et al., 1997). Zusätzlichen Einfluss auf die Effektivität von Zytostatika hat der pH-Wert. Befindet sich dieser aufgrund der hohen Laktatwerte im sauren Bereich, kann die Resorption und/oder Zytotoxizität des Chemotherapeutikums beeinträchtigt werden (Hockel und Vaupel, 2001; Minchinton und Tannock, 2006).

Somit ist Sauerstoff ein essentieller Metabolit für das Tumorwachstum sowie den Tumorerhalt, beeinflusst maßgeblich die Therapieeffizienz und eignet sich als prognostischer Marker (Withers, 1975; Ward, 1988; Sloane et al., 1990; Rozhin et al., 1994; Teicher, 1995; Höckel et al., 1996; Lardner, 2001).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Geräte

Die Tabellen 5, 6 und 7 geben einen Überblick über die verwendeten Geräte.

Tabelle 5: Verwendete Geräte *in vitro*-Versuch

Gerät	Hersteller
Akkupipette Accu-jet pro	BRAND, Wertheim
Autoklav DX-45	Systec, Linden
Fluoreszenzmikroskop BIOREVO BZ-9000	Keyence, Osaka, Japan
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C Forma 900 Series	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Heizmagnetrührer	IKA, Staufen im Breisgau
Kühlschrank 4°C	Bosch, Stuttgart Liebherr, Bulle, Schweiz
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss, Oberkochen
pH-Meter PB-11	Sartorius, Göttingen
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Platereader Fluostar Omega	BMG Labtech, Ortenberg
Schüttler CAT ST5	neo-lab, Heidelberg
Sterilwerkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
VisiSens TD	PreSens, Regensburg
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage KERN 572	KERN, Balingen
Wasserbad	Memmert, Schönaich
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 6: Verwendete Geräte *in vivo*-Versuch

Gerät	Hersteller
<i>In vivo</i> μ CT Skyscan 1176	Bruker, Billerica, USA
Laserthermometer	Etekcitec, Anaheim, USA
MagPix	Luminex, Austin, USA
Sauerstoffsensor PST-1	PreSens, Regensburg

Tabelle 7: Verwendete Geräte Histologie

Gerät	Hersteller
Ausgießstation Tissue-Tek	Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Einbettautomat Shandon Excelsior	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikrotom Leica RM 2165	Leica, Wetzlar
Slidescanner NanoZoomer 2. ORS	Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan
Streckbad HI 1210	Leica, Wetzlar
Wärmeplatte HI 1220	Leica, Wetzlar

1.2. Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in den Tabellen 8-11 aufgeführt.

Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien *in vitro*-Versuch

Verbrauchsmaterial	Hersteller
48-Well-Platte	Eppendorf, Hamburg
96-Well-Platte	Eppendorf, Hamburg
Cryovile 1,5 ml	CM LAB, Esbjerg, Dänemark
Falkon-Röhrchen (50 ml)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Unsterile Handschuhe (Größe S)	ABENA Classic, Oberderdingen
Pasteurpipetten	ROTH, Karlsruhe

Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Star lab, Hamburg
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sensorfolien VisiSens	PreSens, Regensburg
Wägeschälchen	Brand, Wertheim
Zellfilter Filtropur S 0.2	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen T 175	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien *in vivo*-Versuch

Verbrauchsmaterial	Hersteller
EDTA-Blutentnahmeröhrchen Multivette 600	Sarstedt, Nümbrecht
Enthaarungscreme	Pilca, Bühl
Unsterile Handschuhe (Größe S)	ABENA Classic, Oberderdingen
Haube	Farstar, Barsbüttel
Injektionskanüle Sterican 0,40x20 mm, 27 G x ¾	B. Braun, Melsungen
Insulinspritzen (Disposable Insulin Syringes 3-PART, 0,5 ml, 50 IU)	Romed, CH Wilnis, Niederlande
Kanülenentsorgungsbox	Coviedien Sharpsafety, Minneapolis, USA
Mundschutz	Farstar, Barsbüttel
OP-Auflagen (MoliNea S, Krankenunterlagen, 60x90 cm)	Hartmann, Heidenheim
Spritzen Omnifix-F 1 ml	B. Braun, Melsungen
Sterilium virugard	Bode, Hamburg

Tabelle 10: Verwendete Verbrauchsmaterialien Tierhaltung

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Holzgranulat Mäuse	Ssniff, Soest
Mausfutter	Altromin, Lage

Tabelle 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien Histologie

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser 20x20 mm	ROTH, Karlsruhe
Objektträger (Menzelgläser, Superfrost Plus)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

1.3. Puffer/Lösungen/Medium

Die verwendeten Puffer, Medien und Lösungen sind in Tabelle 12-14 aufgelistet.

Tabelle 12: Verwendete Puffer, Medien und Lösungen *in vitro*-Versuche

Material	Hersteller
0,05 % Trypsin-0,02 % EDTA-Lösung	Biochrom AG, Berlin
0,5 % Triton X100	Sigma Aldrich, Missouri, USA
50 % NaOH-Lösung	ROTH, Karlsruhe
aromatisches Kohlenwasserstoffamphiphil (aKA)	AG Pires, Minho, Portugal
DMEM high glucose	Sigma Aldrich, Missouri, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	ROTH, Karlsruhe
Ethanol 70 %	Otto Fischar GmbH, Saarbrücken
Fetal Calf Serum	Sigma Aldrich, Missouri, USA
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	ROTH, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma Aldrich, Missouri, USA
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	ROTH, Karlsruhe

Tri-Reagent (Trizol)	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Trypanblau	Sigma Aldrich, Missouri, USA

Tabelle 13: Verwendete Puffer, Medien und Lösungen *in vivo*-Versuche

Material	Hersteller
80 % Matrigel Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix,	Corning, New York, USA
aromatisches Kohlenwasserstoffamphiphil (aKA)	AG Pires, Minho, Portugal
Aqua ad injectabile	B. Braun, Melsungen
DMEM high glucose	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Ethanol 70 %	Otto Fischar GmbH, Saarbrücken
Isotone Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %)	B Braun, Melsungen
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma Aldrich, Missouri, USA

Tabelle 14: Verwendete Puffer, Medien und Lösungen Histologie

Material	Hersteller
Essigsäure 100 %	ROTH, Karlsruhe
Ethanol 70 %	Otto Fischar GmbH, Saarbrücken
Ethanol 100 %	Otto Fischar GmbH, Saarbrücken
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	ROTH, Karlsruhe
Formalin	ROTH, Karlsruhe
Roti-Histokitt II	ROTH, Karlsruhe
Roti-Histol 6640	ROTH, Karlsruhe

1.4. Färbelösungen Mikroskopie und Histologie

Tabelle 15 gibt einen Überblick zu den genutzten Färbelösungen im Rahmen der Mikroskopie und Histologie.

Tabelle 15: Verwendete Färbelösungen für Mikroskopie und Histologie

Färbelösung	Hersteller
Calcein	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Eosin G-Lösung 0,5 %	ROTH, Karlsruhe
Goldner-Lösung I	ROTH, Karlsruhe
Goldner-Lösung II	ROTH, Karlsruhe
Goldner-Lösung III	ROTH, Karlsruhe
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	ROTH, Karlsruhe
Hämatoxylinlösung nach Weigert	ROTH, Karlsruhe
Hoechst	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Perjodsäurelösung 1 %	ROTH, Karlsruhe
Propidiumiodid (PI)	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Schiffs Reagenz	ROTH, Karlsruhe

2. Methoden

2.1. *In vitro*-Versuch

2.1.1. Verwendete Osteosarkomzellen und Kultur

Zum Einsatz kam die murine K7M2 wt [K7M2-WT]–Osteosarkom-Zelllinie (siehe Kapitel 1.4) von ATCC (ATCC® CRL-2836™), Manassas, USA. Diese wurden tiefgefroren geliefert und direkt nach Anlieferung im Stickstofftank bei ca. -196 °C gelagert.

a) Auftauen der Zellen

Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen aufgetaut. Den auf Eis transportierten Zellen wurde 1 ml 37 °C warmes Medium zugegeben, das Ganze resuspendiert und möglichst schnell in ein Falconröhrchen mit 50 ml 37 °C warmen Medium verbracht. Dies stellt eine ca. 30-fache Verdünnung des im Einfriermedium befindlichen DMSO dar. Beim Einfrieren der Zellen wurde dies zuvor benötigt, da es sonst zur zellschädigenden Kristallbildung kommt. Die Zytotoxizität des DMSO macht die sofortige Verdünnung notwendig. Nach Überführung des kompletten Röhrcheninhalts wurden die Zellen bei 300g und 22°C 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert und das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert, um die Zellen in Zellkulturflaschen auszusäen. Die Kultur erfolgte in Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ in Inkubatoren. Für die weitere Expansion und Kultivierung wurde ein Medium bestehend aus DMEM high glucose, 10 % fetal calf serum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet, welches anschließend steril filtriert wurde. Aus Gründen des Zellmetabolismus und des Zerfalls mancher Bestandteile bei Kulturtemperatur erfolgte zweimal pro Woche ein Mediumwechsel (Seeliger et al., 2013).

Aufgrund der sehr hohen Proliferationsrate dieser Osteosarkomzellen kam es relativ schnell zu einem konfluenten Zellrasen. Eine 100 %ige Konfluenz führt zur Kontaktinhibition, welche die Zellen in ihrem Wachstum hemmt (Stoker und Rubin, 1967). Vor Eintreten einer vollständigen Konfluenz erfolgte die Passagierung der Zellen, das heißt sie wurden mit einer Trypsin-EDTA-Lösung von der Zellkulturflasche abgelöst und auf mehrere neue Kulturgefäße verteilt. Zuvor

erfolgte eine zweifache Spülung der Zellen mit PBS. Dies hatte zum Ziel, Mediumreste zu entfernen, die die Trypsinwirkung einschränken könnten. Nach ca. 5 Minuten Inkubationszeit bei 37°C wurden die abgelösten Zellen nach mikroskopischer Kontrolle mit dem oben genannten Medium vom Flaschenboden abgespült, um die Trypsinwirkung abzustoppen und um das zytotoxische EDTA zu binden. Die Osteosarkomzellen wurden in ein 50 ml-Falcontube verbracht und bei 500 g und 37 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert. Die Zellzählung erfolgte unter Zuhilfenahme von Trypanblau, das nur die Zellmembran toter Zellen passieren kann und somit das Zytoplasma blau anfärbt, und der Neubauer-Zählkammer anhand der Formel:

$$\text{Zellzahl} = n * Vf * V * 10^4$$

n: Gesamtzahl lebende Zellen in allen 4 Großquadraten/4

Vf: Verdünnungsfaktor

V: Volumen der Zellsuspension

10⁴: Kammerfaktor

b) Einfrieren der Zellen

Nicht benötigte Zellen wurden erneut eingefroren. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA vom Flaschenboden abgelöst. Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die Zellen mit Medium abgespült, in ein neues Falconröhrchen verbracht und anschließend bei 500 g und 22 °C 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit frischem Medium resuspendiert und die Zellen nach oben beschriebener Technik gezählt. Nach erneuter Zentrifugation, Absaugen des alten Mediums und Resuspendieren mit kaltem Einfriermedium (bestehend aus 10 % DMSO, 40 % FCS und 50 % Medium) mussten die Zellen (2x10⁶ Zellen pro Cryovile) aufgrund der Zytotoxizität des DMSO so schnell wie möglich in die Cryoviles verbracht werden. Das DMSO ist für ein kristallfreies Einfrieren der Zellen essentiell. Im Anschluss wurden die Zellen sofort in den Cryo-Safe Cooler gesteckt. Dieser wurde dann für einen Tag im -80 °C Freezer platziert, bis die Zellen in den Stickstofftank verbracht wurden (Seeliger et al., 2013).

2.1.2. Versuchsaufbau

Es sollte die Wirkung des aKA in drei unterschiedlichen Konzentrationen (0 mM, 0,5 mM und 1 mM) auf die metabolische Aktivität (MTT-Test) und die Zellmorphologie (Mikroskopie) zu den Zeitpunkten 1, 7, 24 und 48 Stunden untersucht werden (Pires et al., 2015). Dazu wurden die genannten Konzentrationen jeweils in Triplikaten plattiert. Außerdem wurden anhand einer zweiten, identischen Platte mit dem VisiSens-System über 48 Stunden Sauerstoffwerte generiert, um eventuelle Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Oxygenierung zu untersuchen.

2.1.3. Zubereitung der aKA-Lösungen in verschiedenen Konzentrationen

Zunächst mussten Lösungen verschiedener Konzentrationen des aKA hergestellt werden. Hierzu wurde zunächst das aKA ($M=480\text{ g/mol}$) in pulveriger Form mit 1 ml PBS vermischt und eine homogene Suspension bei pH 7,4 hergestellt (Pires et al., 2015). Danach wurde die zum Gesamtvolumen fehlende Menge Zellkulturmedium hinzugefügt und das Ganze steril filtriert ($0,22\text{ }\mu\text{m}$ -Filter). Zu Beginn des Versuchs wurde der aKA-PBS-Mediumlösung nach Filtrieren die benötigte Zellmenge hinzugefügt und 500 μl mit $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Well plattiert. Anschließend erfolgte die 24-stündige Inkubation bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 .

2.1.4. MTT-Assay

Dieser Assay beruht auf der Reduktion des gelben 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Salzes in lebenden Zellen zu purpurfarbigem Formazan durch das mitochondriale Enzym Succinatdehydrogenase (SDH). Anhand dieses Tests konnte im Rahmen des *in vitro*-Versuchs die metabolische Aktivität der Osteosarkomzellen und der Einfluss verschiedener Konzentrationen des aKA auf diese beurteilt und verglichen werden.

Zu Beginn des Assays wurde der Überstand aus den Wells abgenommen und die Zellen zweifach mit PBS gewaschen, um nicht-adhärente Zellen zu entfernen. Danach wurde die Arbeitslösung (Thiazolylblau und PBS) hinzugegeben und die Platte bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 für 2 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der angegebenen Zeit wurde der Überstand abgenommen und die Solubilisationslösung (bestehend aus 5g SDS (w/v), 49,7 ml DMSO und 0,3 ml Essigsäure) hinzugegeben. Die Platte

wurde 5-10 Minuten auf einem Schüttler platziert. Zuletzt wurden 100 µl jedes Wells in eine 96-Well-Platte pipettiert und bei einer optischen Dichte von 570/690 nm im Photometer gemessen. Die Berechnung der Überlebensrate erfolgte durch Subtraktion der Werte $OD_{570} - OD_{690}$ um Durchschnittswerte von Kontrolle und Testproben zu ermitteln (Mosmann, 1983). Zur Kontrolle dienten einerseits unbehandelte Zellen (Positivkontrolle), sowie mit 0,5 % Triton X100 behandelte Zellen (Negativkontrolle).

2.1.5. DNA-Quantifizierungs-Assay PicoGreen

Zur Quantifizierung doppelsträngiger DNA wurde der ultrasensitive fluoreszierende Nukleinsäurefarbstoff Quant iT PicoGreen verwendet. Am Tag des Experiments wurde die Arbeitslösung in einem Plastikröhrchen durch 200-fache Verdünnung der konzentrierten PicoGreen-Lösung mit TE-Puffer (bestehend aus 10 mM Tris-HCl und 1 mM EDTA, pH 7,5). Aufgrund der Photodegradierung des Farbstoffs in Gegenwart von Licht erfolgte das Einwickeln des Plastikröhrchens mit Alufolie. Im Anschluss wurden durch Verdünnen der 50 ng/ml- bzw. 2 µl/ml DNA-Lösung mit der Arbeitslösung zwei Standardkurven (low und high range) vorbereitet. Dann wurden die zu untersuchenden Proben 1:2 mit TE-Puffer verdünnt und anschließend 100 µl Arbeitslösung hinzugegeben. Es folgte eine 5-minütige lichtgeschützte Inkubation bei Raumtemperatur. Im Photometer wurde dann die Fluoreszenzintensität bei 480 nm Exzitation und 520 nm Emmission gemessen. Nach Ende der Messung erfolgte die Subtraktion des Fluoreszenzwerts des Blanks von dem gemessenen Wert jeder Probe. Absolute Werte wurden im Anschluss mit Hilfe der Standardkurven berechnet (Singer et al., 1997).

2.1.6. Mikroskopie

Um die Morphologie der Osteosarkomzellen nach Kontakt mit dem aKA (2 mM) und dessen schädigende Wirkung darzustellen, kam das Fluoreszenzmikroskop zur Evaluation der Calcein- und PI-Färbungen (nach 48h und 7 Tagen) zum Einsatz. Calcein diffundiert durch die Zellmembran in lebende Zellen und fluoresziert grün. PI passiert die Zellmembran toter Zellen und fluoresziert rot. Dabei wurde bei vier- und zehnfacher Vergrößerung im Hellfeld bzw. bei Färbung im Rot- und Grünfluoreszenzkanal mikroskopiert und digitale Fotos davon gemacht.

2.1.7. VisiSens TD-System

Das VisiSens TD-System der Firma PreSens ermöglicht ein noninvasives, zweidimensionales Messen von Sauerstoff in u.a. Zellkulturplatten innerhalb eines Inkubators. Hierzu kamen Sensorfolien zum Einsatz, die auf den Plattenboden geklebt wurden und mit einem Polymer inklusive Fluoreszenzfarbstoff beschichtet sind. LED-Lichtquellen regen diese Fluoreszenzfarbstoffe an, während eine Kamera unterhalb der Platte die vom Sensor wieder emittierte Fluoreszenzintensität detektiert. Trifft ein Sauerstoffmolekül auf den Sensor, so findet ein Energietransfer statt und die emittierte Fluoreszenzintensität sinkt (Abbildung 9). Das Ausmaß der emittierten Fluoreszenzintensität korreliert mit dem Sauerstoffpartialdruck der gemessenen Probe und wird anhand der IDL-Evaluationssoftware ausgewertet. Das Funktionsprinzip verbraucht selbst keinen Sauerstoff, was einen großen Vorteil gegenüber vielen anderen Sauerstoffmessmethoden darstellt.

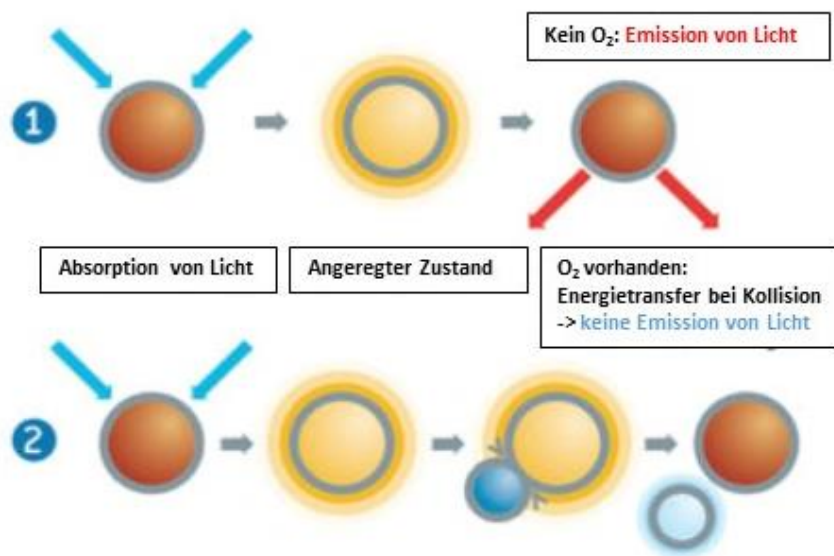


Abbildung 9 : Funktionsprinzip VisiSens-TD. In Gegenwart von Sauerstoff verringert sich die Lichtemission aufgrund des Energietransfers. (<https://www.presens.de/knowledge/basics/detail/measurement-principle-of-chemical-optical-sensors-901.html>)

Nach dem Einkleben unter der sterilen Werkbank wurden die Sensorfolien im Well mit 70 % Ethanol für eine Stunde bedeckt. Danach erfolgte die Abnahme des Alkohols und die Platten wurden zum Trocknen für einige Stunden unter der Werkbank belassen.

Im Anschluss an die abgeschlossene Sterilisation konnte mit dem Plattieren der Zellen begonnen werden. Dies erfolgte nach dem gleichen Schema wie in Kapitel 2.1.2. Anschließend wurde die Platte in den Inkubator verbracht, über der Kamera platziert und die Messung für 48 Stunden mit einer Frequenz von 4 Messungen pro Stunde gestartet. Die Datenauswertung erfolgte mit der IDL-Evaluationssoftware von PreSens. Es galt zu untersuchen, ob Unterschiede hinsichtlich der Oxygenierung zwischen den verschiedenen Konditionen bestehen.

2.1.8. Statistik

Bei den *in vitro*-Ergebnissen dieser Arbeit wurden der Mittelwert \pm Standardabweichung berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikinstituts des Klinikums rechts der Isar, TUM und mittels Software Graphpad Prism, wobei zur Ermittlung der statistischen Signifikanz folgende Tests zum Einsatz kamen: Zunächst wurde jedes Datenset mittels des D'Agostino-Pearson- und Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung untersucht. Da diese nicht vorlag bzw. die Stichprobengröße zu klein für die Beurteilung auf Normalverteilung waren, wurden die metrischen und unabhängigen Stichproben (Vergleich innerhalb eines Zeitpunktes) mittels des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests und multiplen Vergleichstests nach Dunn auf Signifikanz untersucht.

Beim Vergleich von mehr als zwei abhängigen Stichproben (Vergleich innerhalb einer Gruppe an verschiedenen Zeitpunkten) erfolgte die statistische Untersuchung mit Hilfe des nichtparametrischen Friedman-Tests und multiplen Vergleichstests nach Dunn. Im Fall von zwei unabhängigen Stichproben (PicoGreen-Versuch) kam der nichtparametrische Wilcoxon-Mann-Whitney-Test zum Einsatz. Ein p -Wert $< 0,05$ entspricht einem signifikanten Ergebnis.

2.2. *In vivo*-Versuch

2.2.1. Versuchsziele

In Hinblick auf die seit Jahren stagnierenden und unzufriedenstellenden Überlebensraten in der humanen und kaninen Osteosarkomforschung, bedarf es dringend alternativer Therapien und Ansatzpunkte im Kampf gegen diese Neoplasie. Daher sollte nun die *in vivo*-Anwendung des aKA im Mausmodell erfolgen.

Ziel dieses Versuchs war die Evaluation der folgenden Fragen:

- 1) Bestehen signifikante Unterschiede hinsichtlich Tumorprogenie und Metastasierung zwischen behandelten und unbehandelten Tieren?
- 2) Ist die Behandlung mit dem aKA kurativ oder proliferieren die Tumoren nach Ende der Applikation wieder in verstärktem Ausmaß?
- 3) Ergeben sich bei Applikation des aKA mit und ohne Tumorzellimplantation Nebeneffekte toxischer und nicht-toxischer Art?

Zur Klärung dieser Fragen wurden bezüglich Punkt 1 und 2 zu fünf Zeitpunkten μ CT-Scans und die Histologie durchgeführt (näher erläutert in Kapitel 2.2.7, 2.2.9 und 2.2.11). Zur Evaluierung potentieller systemischer Nebeneffekte wurden Plasmaproben hinsichtlich verschiedener Analyten mittels Luminex MagPix untersucht (Kapitel 2.2.12).

2.2.2. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 70 männliche C57BL/6J-Mäuse im Alter von 8-10 Wochen mit einem initialen Gewicht von $25,16 \pm 1,14$ g verwendet. Die Tiere wurden speziell für Versuchszwecke gezüchtet und von Charles River Laboratorien, Sulzfeld bezogen.

Die Versuchsgenehmigung erfolgte gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TSchG) durch die Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen Az.:55.2-1-54-2532-142-2016. Bei Durchführung der Eingriffe an Versuchstieren wurden zu jeder Zeit die geltenden Rechtsbestimmungen des Tierschutzgesetzes (TSchG in der Fassung vom 28. Juli 2014) eingehalten.

2.2.3. Versuchstierhaltung

Die Haltung der Tiere erfolgte im Zentrum für präklinische Forschung (ZPF) des Klinikum rechts der Isar in speziellen einzelbelüfteten Käfigen zur Haltung von Mäusen (Tecniplast-IVC). Die maximale Besatzdichte in einem Mäusekäfig (Typ-I Superlong; Grundfläche 16x37 cm) richtet sich gemäß der EU Richtlinie 2010/63 nach dem Gewicht der Tiere. Es wurden maximal 5 Tiere pro Käfig gehalten. Futter (autoklaviertes Mäusefutter Ratte/Maus, 10 mm rund pelletiert, spezialbehandelt, Haltungsfutter No. 1324SP, Fa. Altromin, Lage) und Wasser (angesäuertes Trinkwasser (1N HCl, pH 3,5 – 3,0)) bei einmaligem Flaschenwechsel pro Woche) erhielten die Tiere ad libitum. Spezielles Holzgranulat (Select Fine, Ssniff, Soest) diente als Einstreu bei zwei Wechseln pro Woche. Nestbaumaterial wurde als autoklavierter Zellstoff zur Verfügung gestellt, ebenso ein Maushaus aus rotem Polycarbonat (Bioscape). Der Raum war speziell als Tierhaltungsraum konzipiert (Personenlimitierte Zutrittskontrolle, Pflege durch ausgebildete Versuchstierpfleger, Klimatisierung, Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden mit Dämmerungsphase). Die Haltung der Tiere erfolgte in Umsetzung der in der EU-Richtlinie 2010/63 festgelegten Bedingungen. Die Eingewöhnungszeit der Tiere betrug mindestens eine Woche.

Der Hygienestatus der Versuchstiere entsprach einem SPF-Status gemäß den FELASA Empfehlungen. Im Rahmen des Hygienemanagements war ein Import aus Trichomonas- oder Pasteurella pneumotropica positivenhaltungen untersagt, um das Auftreten möglichst einzudämmen.

Das Hygienemonitoring erfolgte gemäß den Empfehlungen der FELASA (Untersuchungsfrequenz spätestens alle 3 Monate) und basierte auf der regelmäßigen Untersuchung von Sentinel-Tieren. Es wurden NMRI-nu^{+/-} Tiere als Sentinels verwendet. Ein Sentinelkäfig erhielt benutzte Einstreu (dirtybedding Methode) aus 71 bis maximal 79 Haltungskäfigen (1 Sentinelkäfig pro Rackseite). Die Untersuchungen wurden von einem externen qualitätszertifizierten Fachlabor durchgeführt. Der Betriebsablauf innerhalb des ZPF war durch entsprechende Dokumente (Hygieneregeln, Arbeitsanweisungen etc.) geregelt.

2.2.4. Versuchsgruppen

Tabelle 16: Übersicht der Versuchstiergruppen und jeweilige Tieranzahl

	C57BL/6				
Behandlung	Tumorzell-implantation+ Vehikel (NaCl 0,9 %)	Keine Tumorzell-implantation+ aKA (10 mM)	Tumorzell-implantation	Tumorzell-implantation+ aKA (1 mM)	Tumorzell-implantation + aKA (10 mM)
Anzahl	12+2= 14	12+2= 14	12+2= 14	12+2= 14	12+2= 14
Summe	70				

+2 verdeutlicht die Reservetiere pro Gruppe. mM= millimolar, aKA= aromatisches Kohlenwasserstoffamphiphil.

Wie Tabelle 16 entnehmbar, wurden die insgesamt 70 Mäuse in 5 Gruppen à 14 Tiere (12 Tiere + 2 Reservetiere) eingeteilt. Die erste Gruppe diente als Placebo-Gruppe und erhielt zur Tumorzellimplantation lediglich eine 14-tägige tägliche Injektion von 0,9 % NaCl. Die nächste Gruppe bekam keine Tumorzellen aber eine über 14 Tage tägliche 10 mM aKA-Dosis subkutan zur Evaluierung eventueller systemischer Nebeneffekte. Der dritten Gruppe wurden nur die Tumorzellen implantiert und keinerlei therapeutische Applikation des aKA verabreicht. Der vorletzten und letzten Gruppe wurden die Tumorzellen ebenfalls implantiert und eine 1 mM bzw. 10 mM tägliche aKA-Dosis über 14 Tage appliziert.

2.2.5. Versuchsablauf

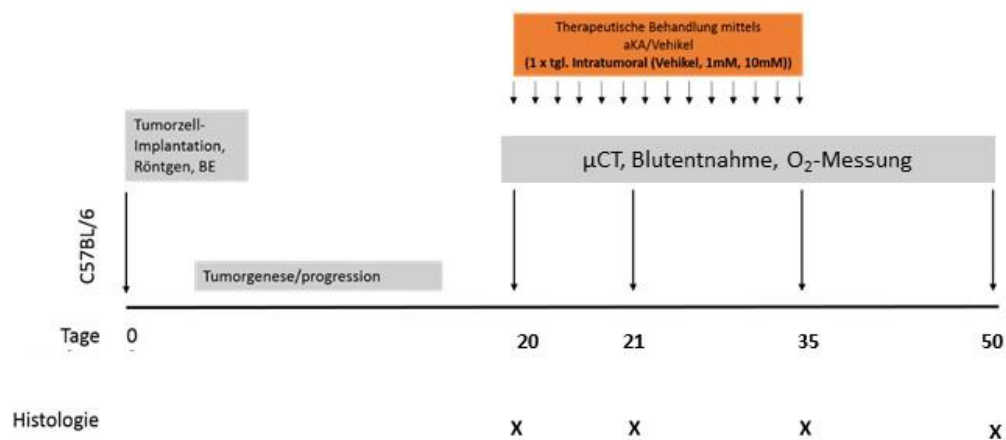


Abbildung 10: Übersicht des Versuchsablaufs. Es sind die jeweiligen Zeitpunkte und Interventionen dargestellt. Kreuze markieren die Histologiezeitpunkte. aKA= aromatisches Kohlenwasserstoffamphiphil, BE= Blutentnahme, mM= millimolar, tgl.= täglich.

Wie Abbildung 10 zeigt, erfolgte an Tag 0 der erste µCT-Scan, eine Blutentnahme (ca. 16 µl, <10 % Körpervolumen) und die intratibiale Tumorzellimplantation. Danach wurde 20 Tage inklusive täglicher Inaugenscheinnahme und Scoring (siehe Score Sheet im Anhang) sowie zweimaligem Wiegen pro Woche abgewartet. Ab Tag 20 wurde zusätzlich zum täglichen Scoring auch täglich gewogen. An Tag 20 (Beginn der Behandlung), 21 (1 Tag post Behandlungsbeginn) und 35 (1 Tag nach Ende der Behandlung) erfolgten Verlaufskontrollen mittels µCT, Blutentnahme, intratibialer Sauerstoffmessung und Euthanasie zweier Mäuse pro Gruppe zu Zwecken der Histologie. Von Tag 20-34 fand zusätzlich die tägliche Applikation des akA/NaCl statt. An Tag 50 wurden alle restlichen Tiere nach µCT-Scan, Blutentnahme und Sauerstoffmessung für die histologische Untersuchung unter Isoflurananästhesie euthanasiert.

2.2.6. Tumorzellimplantation

Vor Implantation wurde die murine Osteosarkomzelllinie K7M2-Matrigel-Lösung unter der sterilen Werkbank hergestellt. Hierfür wurden die Osteosarkomzellen, wie bereits beschrieben in Kapitel 2.1.1, von der Zellkulturflasche gelöst, zentrifugiert und gezählt. Die benötigte Menge Zellen wurde anschließend mit dem entsprechenden Volumen an Matrigel und PBS ohne große Blasenbildung

resuspendiert (Gesamtvolumen von 20 μ l/Maus, 80 % Matrigel mit 1×10^6 Zellen/ml) und umgehend bis zur Implantation auf Eis gelagert (Dass et al., 2006). Die Kontrollgruppe akA (10 mM) erhielt keine Tumorzellen.

Den Tieren wurde 2 Stunden vor Injektion Carprofen (5 mg/kg KG) s.c. verabreicht. Nach diesen 2 Stunden wurden die Tiere mittels Dreifachkombinationsanästhesie narkotisiert (i.p. 0,5 mg/kg KG Medetomidin, 5 mg/kg KG Midazolam, 0,05 mg/kg KG Fentanyl). Die Tiere wurden während des gesamten Procederes auf einer Wärmematte (Temperaturmaximum 40°C) gelagert. Weiterhin wurde eine Augensalbe (Bepanthen) verwendet, um das Austrocknen der Bindehaut zu vermeiden. Auf die entsprechende Injektionsstelle wurde Enthaarungscreme aufgetragen, nach und anschließend mit 70 % Ethanol desinfiziert und gereinigt. Die Injektion der Tumorzellen erfolgte gemäß Abbildung 11.

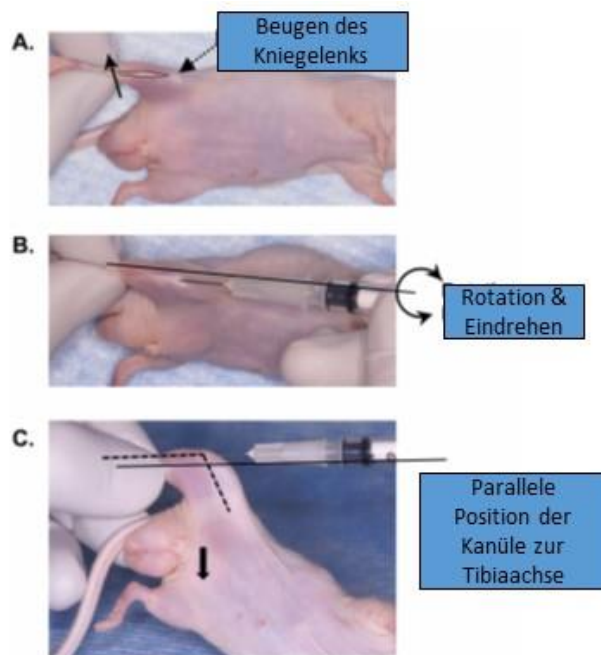


Abbildung 11: Intratibiale Applikation von Osteosarkomzellen aus (Park et al., 2010). In Bild A wird die Positionierung des Beins gezeigt (Beugung des Kniegelenks und Lateralisierung des Beins). In Bild B wird die Kanüle auf dem Tibiakamm positioniert und unter Rotation eingedreht. Bei korrekter Positionierung befindet sich die Kanüle parallel zur Tibiaachse (Bild C).

Vor Beginn der Implantation erfolgte die Präparation der Spritzen: Um eine Luftinjektion und mögliche Luftembolie zu vermeiden, wurde die zu implantierende Kanüle zunächst mit sterilem PBS gespült, sodass der

Kanülenkonus keine Luft mehr enthielt. Eine zweite Spritze wurde mit 150 μ l sterilem PBS aufgezogen und dazu die 20 μ l Matrigel-Tumorzellsuspension aufgezogen. Diese Matrigel-Spritze wurde bis unmittelbar vor der Injektion auf Eis gelagert, um ein Gelieren des Gels zu vermeiden.

Mit Daumen und Zeigefinger wurde dann der laterale und mediale Malleolus fixiert (Abbildung 11A). Nun wurden Fibula und Tibia lateral rotiert und das Knie plantar gebeugt und lateral rotiert (Abbildung 11B-C). Bei korrekter Position wurde der anteriore Tibiakamm deutlich sichtbar (Abbildung 11C). Eine 1 ml-Spritze mit der durchgespülten Kanüle (27 G) wurde entlang der langen Tibiaachse ausgerichtet und perkutan durch das Kniegelenk implantiert (Abbildung 11C). Nach Platzierung der Kanülenspitze auf der proximalen Tibiatuberositas, erfolgte unter halber bis dreiviertel Rotation das Eindrehen. Durch einen Scoutscan mit dem μ CT (Abbildung 12) wurde die korrekte Position der Kanüle bestätigt.



Abbildung 12: Röntgenologische Verifizierung der korrekten Kanülenposition.

Die Kanülenspitze sollte sich in den knöchernen Trabekulae nahe der Wachstumsfuge befinden, nicht im Knochenmarksraum. Nun wurde die erste Spitze mit ausschließlich PBS von der korrekt positionierten Kanüle entfernt und die 1 ml-Spritze mit der Tumorzellsuspension (Gesamtvolumen 20 μ l) aufgesteckt. Dann erfolgte die langsame intratibiale Injektion der Tumorzellsuspension. Im Anschluss wurde die Kanüle entfernt und die Injektionsstelle mit einem Zellstoff 20-30 Sekunden lang komprimiert zur Sicherstellung der Hämostase. Zusätzlich

erhielten die Tiere intraoperativ (20 Minuten vor Ende) Buprenorphin (s.c. 0,05 mg/kg KG) für mind. 24 Stunden alle 8 Stunden. Nach Beenden der Implantation und einer Blutentnahme aus der Vena facialis (ca. 16 µl, <10 % Körpervolumen) wurden die Tiere in ihren Käfig zurückgesetzt und bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose weiterhin beobachtet.

2.2.7. Tumorgenese bis Tag 20

Nach der Tumorzellimplantation erfolgte die tägliche Beobachtung und Scoring inklusive zweimaligem Wiegen pro Woche der Tiere über 20 Tage.

2.2.8. µCT-Tumormarkierung und –scan

20 Tage nach Tumorzellimplantation wurde das Tumorwachstum sowie die Tumorlokalisation und pulmonale Metastasierung mittels µCT untersucht. Dafür wurden die Mäuse durch Inhalationsnarkose (Isofluran) in einer Kammer narkotisiert, anschließend in Bauchlage in das µCT verbracht und unter dieser Narkose gescannt. Die Narkosetiefe wurde in regelmäßigen Abständen überprüft (Atemfrequenz-Aufzeichnung durch *in vivo*-µCT). Der Scan von Tibia und Lunge dauerte ca. 17 Minuten pro Maus. Die Auflösung des CT betrug 35 µm (1000 x 668 Pixel), welche einen Kompromiss zwischen Bildqualität und möglichst niedriger Strahlenbelastung für das Tier darstellt. Es wurde ein 0,5 mm Aluminiumfilter und eine elektrische Spannung von 50 kV verwendet.

a) Parameter Lungenscan:

- Rotation step: 0,9° bei 360°-Rotation und list-mode (frames) 7
- Anpassen der Isoflurankonzentration, um Atemfrequenz zu senken auf ca. 0,7 Atemzüge/Sekunde
- Dauer: ca. 11 Minuten

b) Parameter Tibiascan:

- Rotation step 1° mit snap wide angle-Modus und frames 3
- Dauer ca. 6 Minuten

Die Tumorlokalisation wurde anschließend auf Grundlage dieser Bildgebung von außen mittels Haarentfernung markiert. Anschließend erfolgte die erste therapeutische Injektion noch in Narkose.

2.2.9. Behandlung mittels aKA/Vehikel

Vor Beginn der Injektion erfolgte für alle Gruppen (außer Vehikel-Gruppe) die Zubereitung des aKA. Dazu wurde die benötigte Menge des pulverigen aKA abgewogen und in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen verbracht. Danach wurde unter der sterilen Werkbank die der gewünschten Konzentration entsprechende Menge sterilen PBS hinzugegeben und das Ganze gut vermischt, sodass ein vollständiges Auflösen des Pulvers gewährleistet war. Im Anschluss erfolgte das Filtern mit einem 0,2 µm-Filter in ein steriles 50 ml-Falcon-Röhrchen um Keimfreiheit sicherzustellen. 50 µl des sterilen aKA wurden dann in ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und anschließend mit einer 0,5 ml-Insulinspritze aufgezogen. Bei der Vehikel-Gruppe wurden 50 µl 0,9 % NaCl-Lösung mit einer 0,5 ml-Insulinspritze aufgezogen.

Die von außen markierte Injektionsstelle wurde gründlich gereinigt und desinfiziert (Ethanol 70 %) und anschließend mittels 27 G Kanüle zentral im Tumor (von außen) platziert. Die Nadel wurde nach Punktion in der Injektionsstelle belassen und der korrekte Sitz (intratumoral) mittels o.g. Bildgebung überprüft. Bei korrekter Position wurden 50 µl Gesamtvolumen (Vehikel/ 1 mM aKA/ 10 mM aKA) in den/die Tumor/Tibia injiziert. Der Kontrollgruppe ohne Tumorzellimplantation wurden 50 µl aKA (10 mM) subkutan injiziert. Im Anschluss an die Injektion des aKA wurde den Tieren zur Verlaufskontrolle EDTA-Blut unter Narkose aus der V. facialis entnommen (ca. 16 µl, <10 % Körpervolumen). Die Einstichstelle wurde nach Entfernen der Kanüle auf Hämostase überprüft. Anschließend wurde die Maus auf die Wärmematte gelegt und erst nach dem völligen Wiedererlangen des Bewusstseins in den Käfig verbracht. Die Injektion des aKA/Vehikels erfolgte über 14 Tage täglich (Tag 20-33). Danach folgte ein Tag zur Erholung der Tiere bevor an Tag 35 erneut Lunge und Tibia gescannt wurden.

2.2.10. Verlaufskontrolle mittels µCT, Blutentnahme (BE)

Im Anschluss an die therapeutische Applikation wurden die Tiere für weitere zwei Wochen beobachtet. Während des gesamten Untersuchungs- und Behandlungszeitraums von Tag 20 bis Tag 50 (Versuchsende) wurden in regelmäßigen Abständen Verlaufskontrollen durchgeführt (Tag 21, 35, 50). Wie oben beschrieben, wurden die Tiere unter Isoflurannarkose im µCT untersucht

(Tumorgröße und Lokalisation, Metastasen), sowie Blut aus der V. facialis (ca. 16 µl, <10 % KG) unter Narkose entnommen.

Das Blut wurde nach Entnahme 10 Minuten bei 500 g und 22 °C zentrifugiert und das Plasma in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Bis zur weiteren Analyse wurden die Plasmaproben im -80 °C-Gefrierschrank gelagert.

2.2.11. Sauerstoffmessungen intratibial

An den Zeitpunkten Tag 20, 21, 34 und 50 wurden bei den Histologietieren physiologische Sauerstoffdaten intraossär mit PSt-1-Sensoren (PreSens) gemessen (Abbildung 13). Eine Messung der nicht für die Histologie bestimmten Tiere war aus Tierschutzgründen nicht möglich (Möglichkeit des Sensor-Abbrechens, starke Blutung o.Ä.). Nach Abschluss des µCT-Scans wurde das gesunde Bein ohne Tumorzellen (an Tumorbein sonst keine Tumorphistologie mehr möglich) gründlich gereinigt und mit 70 % Ethanol desinfiziert. Der in einer Kanüle befindliche Sensor wurde wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben in die Tibia implantiert. Um eine adäquate Temperaturkompensation gewährleisten zu können, wurde die Temperatur des Beins nach Ethanolapplikation und Sensorimplantation mit einem Laserthermometer gemessen. Die gemessene Temperatur wurde anschließend in die Software eingepflegt und die Messung nach Ausfahren des Lichtleiters gestartet. Nach einer stabilen Phase von ca. 60-120 Sekunden wurde die Messung beendet und der Lichtleiter wieder in die Kanüle rückverlagert, sowie der Sensor vorsichtig aus dem Bein ausgedreht. Anschließend erfolgte die Euthanasie per zervikaler Dislokation. Tabelle 17 veranschaulicht die Tierzahlen pro Zeitpunkt und Gruppe.



Abbildung 13: Intratibiale Sauerstoffmessung mit einem PSt-1-Sensor (PreSens), Pfeil zeigt auf Implantationsstelle.

Tabelle 17: Übersicht Mausanzahl pro Gruppe und Zeitpunkt für die intratibiale Sauerstoffmessung

Gruppe	Tag 20	Tag 21	Tag 35	Tag 50
Vehikel	2	1	1	4
Keine TZ	1	2	1	4
Nur TZ	0	0	0	6
1 mM aKA	1	1	2	5
10 mM aKA	2	1	2	1

aKA= aromatisches Kohlenwasserstoffamphiphil, mM= millimolar, TZ= Tumorzellen.

2.2.12. Versuchssende

Am Tag 50 wurden die noch im Versuch befindlichen Tiere nach der Verlaufskontrolle (μ CT, Blutentnahme) und Sauerstoffmessung ebenfalls unter Isoflurannarkose mittels zervikaler Dislokation getötet.

2.2.13. μ CT-Analyse

Die vorbereitende Rekonstruktion der Scans begann mit der Software NRecon (Bruker, Billerica, USA). Hierfür wurden die folgenden Parameter verwendet:

- a) Weichzeichnen (Smoothing): 3
- b) Ringartefaktkorrektur: 10
- c) Röntgenstrahlaufhärtungskorrektur (Beam Hardening Correction): 3
- d) Kontrast-Schwellwerte: 0 und 0,6

Anschließend wurden die Scans im DataViewer (Bruker, Billerica, USA) in standardisierter Weise rotiert und die Region of interest (ROI) in der CTAn-Software (Bruker, Billerica, USA) ausgewählt. Die Schwellwerte lagen hier bei 50 und 255. Nach erneuter Rotation und Speichern des koronaren Datensets im DataViewer wurde die Datei wiederum in der CtAn-Software geöffnet. Hier wurde nun die ROI der proximalen Tibia mit einer Schichtdicke von $2,65 \text{ mm} \pm 41$ Schnitten (Abbildung 14) und ohne Fibula ausgewählt. Diese Schichtdicke schließt

den am größten gewachsenen Tumor ein und wurde bei allen Dateien einheitlich verwendet. Im letzten Schritt wurde die zuvor erstellte VOI (Volume of interest)-Datei in der CTAn-Software geöffnet und der exakte ROI der proximalen Tibia in der zuvor erwähnten Schichtdicke markiert.

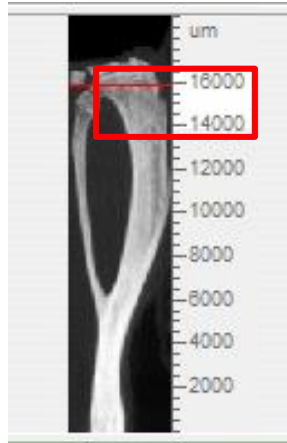


Abbildung 14: Für die Analyse in CTAn-Software verwendeter proximaler Tibiateil (rotes Kästchen).

Anschließend führte die Software die Analyse anhand einer individuellen Aufgabenliste durch und die ermittelten Werte konnten in eine Excel-Tabelle überführt werden.

Es wurden vier verschiedene Parameter analysiert:

- a) TV (Tissue volume) = Gesamtgewebenvolumen
- b) BV (Bone volume) = Knochenvolumen
- c) BV/TV % = Verhältnis von Knochen- zu Gesamtgewebenvolumen
- d) BMD (Bone mineral density) = Knochenmineraldichte ist die volumetrische Dichte von Kalzium-Hydroxyapatit in g/cm^3

Vor Beginn der Analyse bedurfte es zur akkuraten Bestimmung der Knochenmineraldichte einer Kalibration des μCT mittels Kalzium-Hydroxyapatit-Phantomen ($0,25 \text{ g/cm}^3$ und $0,75 \text{ g/cm}^3$) der Größe 2 mm. Diese Phantome besitzen in etwa denselben Kalzifizierungsgrad wie Mausknochen. Es ist essentiell die empfohlene Größe einzuhalten, aufgrund des größenabhängigen Röntgenstrahlauhhärtungseffekts. Des Weiteren nimmt bei einer *in vivo*-Messung

das umgebende Gewebe (Fett, Muskeln und Haut) Einfluss auf den BMD-Wert. Daher wurden die beiden Phantome in wassergefüllten 0,5 ml-Reaktionsgefäßen (entspricht in etwa dem Durchmesser eines Mausbeins) mit denselben Parametern wie die Tibiae gescannt. Die Phantom-Scans wurden anschließend auf die gleiche Art und Weise im NRecon rekonstruiert. In dieser Arbeit wurde die Kalibration mittels AC, attenuation coefficient (Schwächungskoeffizient), durchgeführt. Dieser Koeffizient stellt die Einheit für die exponentielle Röntgenstrahlabschwächung in einem Material dar. Die beiden rekonstruierten Phantom-Scans wurden anschließend im CT-An geöffnet und die Kalibration wie folgt implementiert. Es wurde jeweils ein zirkulärer ROI von 150 Schichtbildern im Phantomscan ausgewählt, der einen gewissen Abstand zum Rand und den Enden freilässt. In der binären Ansicht wurde dann ein Histogramm des Datensatzes (innerhalb des ROI) erzeugt und der AC errechnet. Diese ermittelten AC-Werte konnten anschließend in die Kalibrationsmaske der CTAn-Software eingepflegt werden (Abbildung 15), welche die finale Kalibration errechnete.

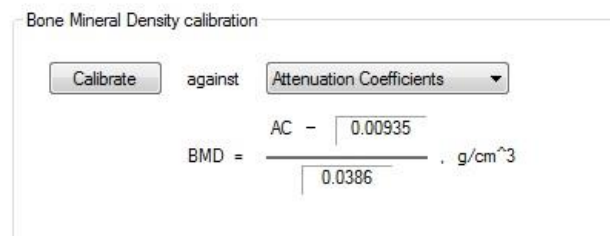


Abbildung 15: Kalibrationsmaske der CTAn-Software. BMD= Bone mineral density, AC= Attenuation Coefficient. g/cm^3 = Gramm pro Kubikzentimeter.

Tabelle 18 veranschaulicht die Tierzahlen pro Zeitpunkt und Gruppe.

Tabelle 18: Übersicht Mauseanzahl pro Gruppe und Zeitpunkt für die μ CT-Analyse

Gruppe	Tag 0	Tag 20	Tag 21	Tag 35	Tag 50
Vehikel	10	11	9	8	6
Keine TZ	12	12	10	8	6
Nur TZ	11	14	12	10	8
1 mM aKA	13	13	12	10	8
10 mM aKA	14	14	11	9	7

aKA = aromatisches Kohlenwasserstoffamphiphil, mM= millimolar, TZ= Tumorzellen

2.2.14. Luminex MagPix

Die Untersuchung der Plasmaproben erfolgte mit einem Luminex MagPix Multiplex, dessen Analysetechnik auf dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) basiert. Die MagPix Multiplex-Technik ermöglicht im Gegensatz zum klassischen ELISA die simultane Analyse mehrerer Messgrößen in einer Probe. Ermöglicht wird dieses Parallelauslesen durch unterschiedlich farbige Magnetpartikel (Beads) inklusive analyt-spezifischer Antikörperbeschichtung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proteine IL-6, TNF- α und VEGF analysiert. Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) sind inflammatorische Marker, die auch im neoplastischen Zusammenhang eine Rolle spielen (Il'yasova et al., 2005).

Die Plasmaproben wurden zunächst 1:4 verdünnt und 10 Minuten bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden 50 μ l von Probe, Standardreihe und Blank pro Well plattiert. Es folgte eine zweistündige Inkubationszeit auf dem Shaker bei 800 rpm. Waren die Analyten in der Probe vorhanden, banden sie während dieser Inkubationszeit an die Beads. Im Anschluss erfolgte ein dreimaliges Waschen mit Waschpuffer auf der Magnetplatte. Nach Zugabe von 50 μ l Biotin-gekoppelter Sekundärantikörperlösung (IL-6, TNF- α und VEGF) pro Well wurde eine weitere Stunde auf dem Shaker bei 800 rpm inkubiert. Die Sekundärantikörper sind dabei ebenfalls spezifisch an den Analyten bindend. Nachfolgend erfolgte wieder ein dreifach wiederholter Waschgang. Anschließend

wurde der Streptavidin-Phycoerythrin-Komplex (50 µl pro Well) hinzugegeben, der eine quantitative Analyse möglich gemacht. Nach 30-minütiger Inkubationszeit auf dem Shaker, Waschgang, Zugabe von 100 µl Waschpuffer pro Well und einer letzten zweiminütigen Inkubation auf dem Shaker erfolgte das Auslesen durch das Magpix-Gerät. Dieses analysiert jede Probe hinsichtlich Beadsfarbe, erkennt daran den jeweiligen Analyten und misst die Fluoreszenzintensität des Streptavidin-Phycoerythrin-Komplexes. Letzere ist wiederum proportional zur Analytkonzentration. Die absolute Quantifizierung erfolgte anhand der Standardreihe.

Tabelle 19 veranschaulicht die Tierzahlen pro Zeitpunkt und Gruppe.

Tabelle 19: Übersicht Mausanzahl pro Gruppe und Zeitpunkt für die Plasmaprobenanalyse mittels Luminex MagPix. Nach dem Schrägstrich ist jeweils die Gesamtzahl der verbliebenen Tiere zum entsprechenden Zeitpunkt angegeben

Gruppe	Tag 0	Tag 20	Tag 21	Tag 35	Tag 50
Vehikel	4/12	2/12	1/10	7/8	6/6
Keine TZ	0/12	2/12	2/10	5/8	6/6
Nur TZ	12/14	12/14	2/12	7/10	7/8
1 mM aKA	13/14	2/14	2/12	6/10	5/8
10 mM aKA	14/14	1/14	1/12	6/10	6/8

aKA= aromatisches Kohlenwasserstoffamphiphil, mM= millimolar, TZ= Tumorzellen

2.2.15. Histologie

Zusätzlich zu den Verlaufskontrollen wurden an den Tagen 20, 21 und 35 jeweils zwei Tiere pro Gruppe nach der Untersuchung (μ CT, Blutentnahme, Sauerstoffmessung) noch in Narkose getötet (zervikale Dislokation). Diese Tiere dienten der histologischen Evaluation der Tumorprogression.

Entnommen wurden die Leber, eine Niere, die Lunge und die Tibia (mit Tumorzellen, bei der Vehikelgruppe Tibia ohne Tumorzellen). Nach Entnahme wurden die Organe mit PBS von außen gespült und für 24 Stunden in 3,7 % Formaldehyd bei 4 °C eingelegt. Nach Verstreichen dieser 24 h wurden die Proben erneut mit PBS gewaschen und in 70 % Ethanol bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Die Tibiae durchliefen vor Beginn der Histologie zusätzlich den Prozess der Dekalzifizierung. Hierzu wurde 400 g EDTA in 2800 ml ddH₂O aufgelöst und für eine Stunde auf dem Heizmagnetrührer platziert. Anschließend erfolgte das Einstellen des pH auf 7,4 mit 50 % NaOH-Lösung. Das Gesamtvolumen wurde auf 4000 ml mit ddH₂O erhöht und nachfolgend die Knochenproben in beschrifteten Histologiekassetten in einem Netz für 7 Tage in die 10 %-ige EDTA-Lösung verbracht. Alle 4 Tage erfolgte das Austauschen der EDTA-Lösung. Der Fortschritt der Dekalzifizierung wurde mittels einer feinen Nadel überprüft, wobei im dekalzifizierten Zustand der Knochen problemlos mit der Nadel durchstochen werden konnte. Die Knochenlagerung erfolgte nach Beenden der Dekalzifizierung wieder in 70 % Ethanol.

Zunächst erfolgte dann die Einbettung der Proben in Paraffin und das anschließende Schneiden mit dem Mikrotom in 5 μ m (Leber, Lunge, Niere) bzw. 4 oder 7 μ m (Knochen) dicke Scheiben. Diese Schnitte wurden nachfolgend auf Objektträger aufgebracht. Für ein optimales Färbeergebnis mussten die Schnitte erst wieder mittels absteigender Alkoholreihe entparaffiniert werden.

2.2.15.1. Hämalaun-Eosin-Färbung (H.-E.-Färbung)

Zunächst wurde die klassische Übersichtsfärbung Hämalaun-Eosin-Färbung durchgeführt. Hämalaun färbt alle basischen Strukturen, wie z.B. Zellkerne und DNA, blau an. Eosin hingegen färbt azidophile Strukturen, wie Mitochondrien,

Kollagen und Zellplasma-Proteine rot an.

Zunächst wurden die Schnitte mit Roti-Histol entwacht und über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation in Hämalaun und das 15-minütige Bläuen mit fließendem Leitungswasser. Danach wurden die 5 µm dicken Leber-, Lungen- und Nierenschnitte 5 Minuten und die 7 µm dicken Knochenschnitte 2,5 Minuten in Eosin inkubiert. Überschüssige Eosin-Färbelösung wurde nach Ablauf der Zeit mit destilliertem Wasser abgespült und die Schnitte anschließend mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Abschließend erfolgte eine 5-minütige Inkubation in Rotihistol, bevor die Schnitte zum Trocknen unter dem Abzug belassen und die Deckgläschen mit Roti-Histokitt aufgebracht wurden.

2.2.15.2. Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung stellt eine Kombination aus Goldner-Färbelösung I, II und III sowie der Hämatoxylinlösung nach Weigert dar. Letzere dient der Blaufärbung der Zellkerne. Goldner-Färbelösung I besteht aus Ponceau (Rotfärbung von Muskelfasern und Cytoplasma) und Fuchsin (Rotfärbung des Bindegewebes). Goldner-Färbelösung II beinhaltet Orange G (Orangefärbung der Erythrozyten) sowie Wolframato-phosphorsäure (Entfärbung des Bindegewebes). Zuletzt wird mit Hilfe der Goldner-Färbelösung III und dem enthaltenen Light green SF yellowish das Bindegewebe grün angefärbt.

Zunächst erfolgte das Deparaffinieren und Rehydrieren der Knochenschnitte. Anschließend wurden die Schnitte 3 Minuten in Hämatoxylin inkubiert und unter fließendem Leitungswasser 10 Minuten gebläut. Danach wurde über 7 Minuten in Goldner-Färbelösung I inkubiert und nachfolgend 30 Sekunden mit 1 % Essigsäure gespült. Zur Entfärbung des Bindegewebes erfolgte eine 10-25 minütige Inkubation in Goldner-Färbelösung II und ebenfalls eine 30-sekündige Spülung mit 1 % Essigsäure. Zum Schluss wurden die Schnitte 4 Minuten in Goldner-Färbelösung III inkubiert und 4 Minuten mit 1 % Essigsäure gewaschen. Vor dem Eindeckeln mit Roti-Histokitt erfolgte die Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe und eine 5-minütige Inkubation in Roti-Histol.

2.2.15.3. Perjodsäure-Schiffs (PAS) – Färbung

Perjodsäure dient der Oxidierung von freien 1,2-Glykolgruppen zu Aldehydgruppen, welche nachfolgend durch das Schiffs Reagenz rot gefärbt werden. Hämalaun färbt die Zellkerne als Gegenfärbung blau.

Die Nierenschnitte wurden entparaffiniert und mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Nach kurzem Spülen mit destilliertem Wasser erfolgte eine 10-minütige Inkubation in Perjodsäure. Im Anschluss wurden die Schnitte 10 Minuten mit Leitungswasser gewaschen und 2x2 Minuten mit destilliertem Wasser gespült. Danach erfolgte eine x-minütige Inkubation mit Schiffs Reagenz bei Raumtemperatur und das Waschen mit warmem Leitungswasser über 5 Minuten. Nach einem kurzen Spülgang mit destilliertem Wasser wurden die Zellkerne 5 Minuten mit Hämalaun gefärbt und im Anschluss 15 Minuten mit fließendem Leitungswasser gebläut. Die Schnitte wurden dann mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, 5 Minuten in Rotihistol inkubiert und zum Trocknen unter dem Abzug belassen. Zum Schluss wurden die Deckgläschen mit Roti-Histokitt aufgebracht.

2.2.15.4. Einscannen der histologischen Schnitte

Alle Schnitte wurden nach Beenden des Färbevorgangs und Trocknungszeit mit einem Slidescanner (NanoZoomer 2. ORS, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) und der zugehörigen NDP.view 2-Software in 20-facher Vergrößerung digitalisiert.

2.2.16. Statistik

Bei den *in vivo*-Ergebnissen dieser Arbeit wurde für die Balkendiagramme der Mittelwert \pm Standardabweichung und für die Box-Whisker-Plots der Median, 25- und 75 %-Perzentil berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Graphpad Prism, wobei zur Ermittlung der statistischen Signifikanz folgende Tests zum Einsatz kamen: Zunächst wurde jedes Datenset mittels des D'Agostino-Pearson- und Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung untersucht. Da diese nicht vorlag bzw. die Stichprobengröße zu klein für die Beurteilung auf Normalverteilung waren, wurden die metrischen und unabhängigen Stichproben (Vergleich innerhalb eines Zeitpunktes) mittels des nichtparametrischen Kruskal-

Wallis-Tests und multiplen Vergleichstests nach Dunn auf Signifikanz untersucht.

Der Vergleich von mehr als zwei abhängigen Stichproben (Vergleich innerhalb einer Gruppe an verschiedenen Zeitpunkten) erfolgte die statistische Untersuchung mit Hilfe des nichtparametrischen Friedman-Tests und multiplen Vergleichstests nach Dunn.

Ein p-Wert $< 0,05$ entspricht einem signifikanten Ergebnis.

IV. ERGEBNISSE

1. *In vitro*-Versuch

1.1. MTT-Assay

Abbildung 16 zeigt die Zellviabilität der verschiedenen Versuchsgruppen an vier aufeinander folgenden Zeitpunkten. Dabei erreichte die Kontrollgruppe (unbehandelte K7M2-Zellen) zu allen Zeitpunkten die höchsten Werte (1 h: $0,080 \pm 0,003$, 7 h: $0,044 \pm 0,005$, 24 h: $0,044 \pm 0,005$ und 48 h: $0,056 \pm 0,047$). Die Zellviabilität der 0,5 mM- und 1 mM-Gruppe fiel mit fortschreitender Zeit massiv ab. Zum Zeitpunkt 1 Stunde verfügte die 0,5 mM-Gruppe über die niedrigste Zellviabilität ($0,074 \pm 0,008$), gefolgt von der 1 mM-Gruppe ($0,078 \pm 0,007$). Es bestanden keinerlei signifikante Differenzen. Nach 7 Stunden war eine dosisabhängige Verteilung zu beobachten. Die niedrigsten Werte wies die 1 mM-Gruppe auf ($0,030 \pm 0,001$), was einen signifikanten Unterschied im Vergleich mit der Kontrollgruppe darstellt ($p = 0,0339$). Dies traf nicht auf die 0,5 mM-Gruppe zu ($0,038 \pm 0,005$). 24 Stunden nach aKA-Exposition setzte sich dieser Trend fort. Die 0,5 mM-Gruppe verfügte über minimal höhere Werte ($0,002 \pm 0,003$) als die 1 mM-Gruppe ($0,00 \pm 0,003$). Es bestand weiterhin ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und 1 mM-Gruppe ($p = 0,0395$). Nach 48 Stunden wiesen sowohl 0,5 mM- ($0,003 \pm 0,001$), als auch 1 mM-Gruppe ($0,005 \pm 0,002$) sehr niedrige Zellviabilitäten auf. Diese waren beide im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedriger ($p = 0,0027$ bzw. $p = 0,0032$).

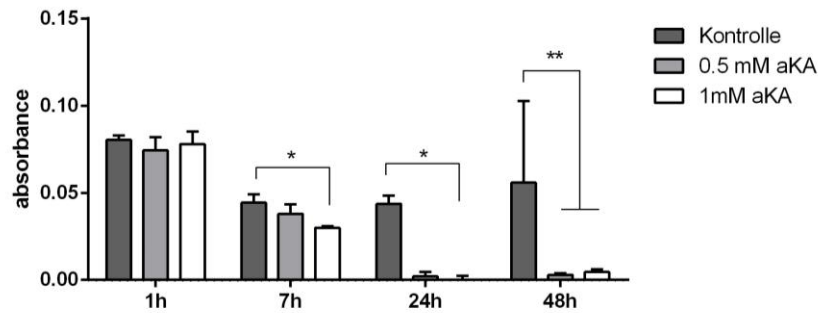


Abbildung 16: Übersicht Zellviabilitäts-Ergebnisse mittels MTT-Test nach 1, 7, 24 und 48 Stunden. Als Kontrolle fungierten unbehandelte K7M2-Zellen. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test kombiniert mit multiplen Vergleichstests nach Dunn. Signifikanzlevel wurden wie folgt gekennzeichnet: $p < 0,05$ (*) und $p < 0,01$ (**). aKA= aromatisches Kohlenwasserstoff-Amphiphil, mM= millimolar.

In Abbildung 17 werden die Zellviabilitätsergebnisse nach 3 und 7 Tagen im Vergleich zu unbehandelten K7M2-Zellen (Positivkontrolle) und einer Negativkontrolle (mit 0,5 % Triton behandelte K7M2-Zellen) verdeutlicht. Auch hier konnte der schädigende Effekt des aKA auf die K7M2-Zellen deutlich gemacht werden. An Tag 3 war ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle ($0,032 \pm 0,003$) und 1 mM-Gruppe ($0,018 \pm 0,007$) auszumachen ($p = 0,0159$). Die Triton-Gruppe lag dazwischen ($0,023 \pm 0,002$). Zum Zeitpunkt 7 Tage wies die 1 mM-Gruppe deutlich geringere Werte ($0,003 \pm 0,001$) im Vergleich zur Kontrollgruppe auf ($0,124 \pm 0,022$). Die mit Triton behandelten Zellen wiesen eine Zellviabilität von ($0,000 \pm 0,001$) auf. Dies war signifikant weniger verglichen mit der Kontrollgruppe ($p = 0,0013$).

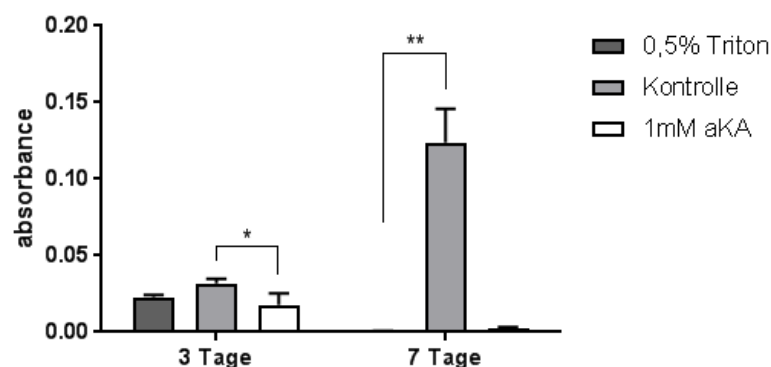


Abbildung 17: MTT-Ergebnisse nach 3 und 7 Tagen. Mit 0,5 % Triton behandelte K7M2-Zellen dienten als Negativkontrolle, unbehandelte K7M2-Zellen als Positivkontrolle. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test kombiniert mit multiplen Vergleichstests nach Dunn. Signifikanzlevel wurden wie folgt gekennzeichnet: $p < 0,05$ (*) und $p < 0,01$ (**). aKA= aromatisches Kohlenwasserstoff-Amphiphil, mM= millimolar.

1.2. DNA-Quantifizierungs-Assay PicoGreen

7 Tage nach Kontakt mit der 1 mM-Dosis aKA wiesen die behandelten K7M2-Zellen signifikant niedrigere DNA-Konzentrationen ($61,31 \pm 1,43$ ng/ml) auf als die unbehandelten K7M2-Zellen-Kontrolle ($196,09 \pm 12,32$ ng/ml) ($p = 0,0055$). Abbildung 18 verdeutlicht diese Ergebnisse.

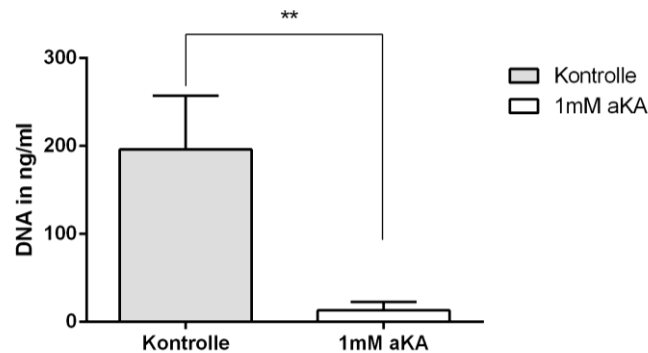


Abbildung 18: Ergebnisse DNA-Quantifizierung von Kontrollgruppe (unbehandelte K7M2-Zellen) und 1 mM-aKA-Gruppe nach 7 Tagen. Die statistische Analyse erfolgte mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Signifikanzlevel wurden wie folgt gekennzeichnet: $p < 0,01$ (**). aKA= aromatisches Kohlenwasserstoff-Amphiphil, DNA= Desoxyribonuclein acid, mM= millimolar.

1.3. Mikroskopie

Die osteosarkomzellschädigende Wirkung war zusätzlich anhand der mikroskopischen Bildgebung nachvollziehbar. Abbildung 19 verdeutlicht die morphologischen Unterschiede zu den Zeitpunkten 48 Stunden und 7 Tage bei Kontrolle und behandelten K7M2-Zellen.

In der Hellfeldmikroskopie zeigte die unbehandelte Kontrolle an beiden Zeitpunkten eine normale spindelförmige Morphologie der Zellen mit Zell-Zellkontakten sowie eine deutliche Zellproliferation nach 7 Tagen. Die mit 2 mM aKA behandelten Zellen erschienen bereits nach 48 Stunden rundlich und apoptotisch (kleinere Zellen, dicht gepackter Zellkern oder in mehrere Teile zerfallen, keinerlei Zell-Zellkontakt), was zum Zeitpunkt Tag 7 ebenfalls zu beobachten war.

Der Vergleich von mit Calcein- und PI-gefärbten unbehandelten Kontrollzellen und mit aKA behandelten Zellen bei Ansicht im Grün- und Rotfluoreszenzkanal verdeutlichte die unterschiedlichen Viabilitäten. Der direkte Vergleich an Tag 7

zeigte überwiegend lebendige (grün fluoreszierende) Zellen bei der Kontrolle im Gegensatz zu vorwiegend toten Zellen (rot fluoreszierend), die mit der 2 mM aKA-Dosis behandelt worden waren.

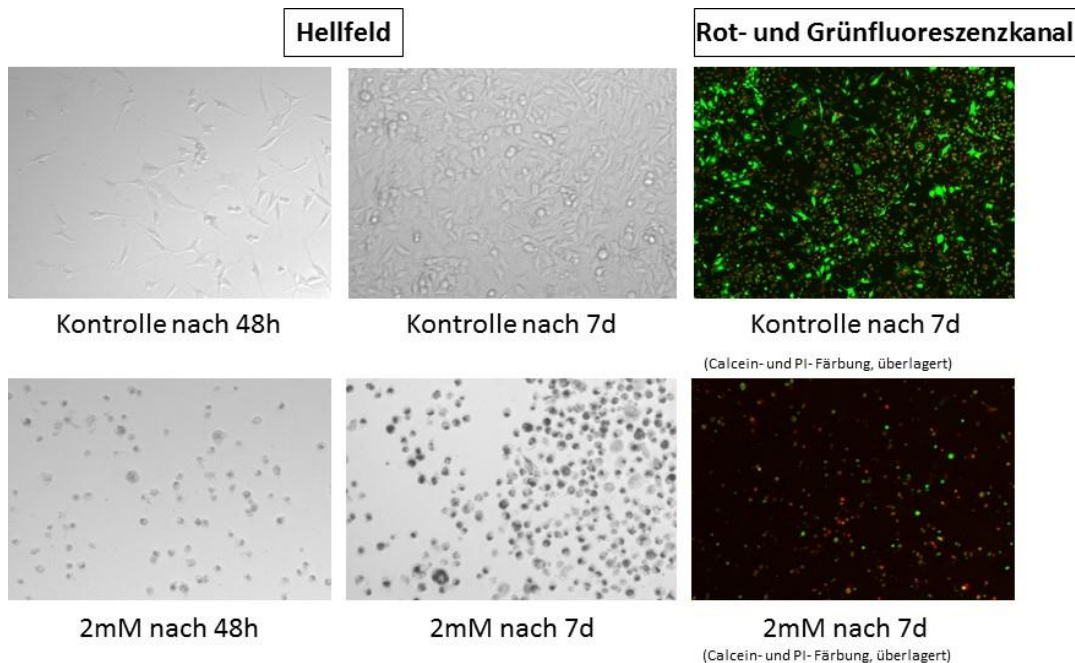


Abbildung 19: Übersicht Mikroskopiebilder von Kontrolle (unbehandelte K7M2-Zellen) und 2 mM-Gruppe (K7M2-Zellen, die einer 2 mM Dosis aKA ausgesetzt waren) zu den Zeitpunkten 48 h und 7 Tage. Die vier linken Bilder wurden im Hellfeld bei 10-facher Vergrößerung mikroskopiert. Die zwei rechten Bilder nach Färbung mit Calcein und PI bei 10-facher Vergrößerung im Rot- und Grünfluoreszenzkanal (anschließend überlagert). aKA=aromatisches Kohlenwasserstoff-Amphiphil, d= Tage, mM=millimolar, PI=Propidiumiodid.

1.4. Sauerstoffmessungen mit VisiSens

Während der ersten 24 Stunden wies die 0,5 mM-Gruppe die geringsten Sauerstoffwerte auf ($18,53 \pm 1,66 \% O_2$). Die 1 mM-Gruppe verfügt über eine etwas höhere Oxygenierung ($19,46 \pm 0,72 \% O_2$). An der Spitze liegt die Kontrollgruppe (unbehandelte K7M2-Zellen) ($19,88 \pm 0,72 \% O_2$). Innerhalb des zweiten Tages scheint sich ein dosisabhängiger Trend einzustellen: Die Kontrollgruppe weist nun die geringsten Werte auf ($18,40 \pm 0,92 \% O_2$), die 0,5 mM-Gruppe liegt im Mittelfeld ($19,07 \pm 1,72 \% O_2$) und die 1 mM-Gruppe zeigt die höchsten Sauerstoffwerte ($20,13 \pm 0,53 \% O_2$).

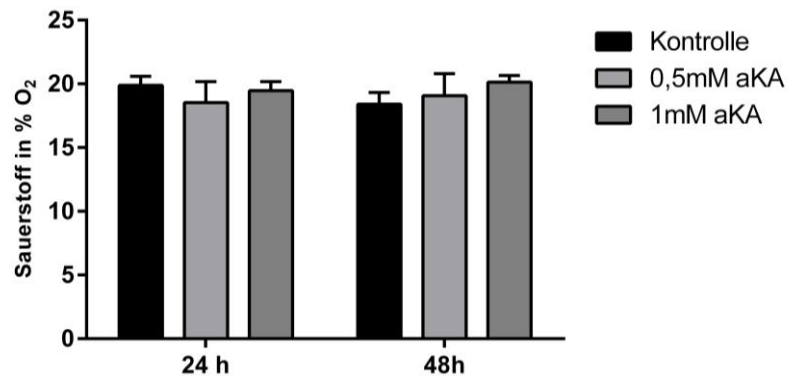


Abbildung 20: Ergebnisse Sauerstoffmessungen mittels VisiSens-System innerhalb des ersten Tages (24h) und zweiten Tages (48h) bei Kontrollgruppe (unbehandelte K7M2-Zellen), 0,5 mM-Gruppe (K7M2-Zellen, die 0,5 mM aKA exponiert waren) und 1 mM-Gruppe (K7M2-Zellen, die 1mM aKA exponiert waren). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte inklusive Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte mittels Friedman-Test kombiniert mit multiplen Vergleichstests nach Dunn. Es konnte keinerlei statistische Signifikanz ermittelt werden. aKA= aromatisches Kohlenwasserstoff-Amphiphil, mM= millimolar.

1.5. Fazit

Analog zu den Versuchen von Pires et al. (Pires et al., 2015) konnte die Wirksamkeit des aKA auf K7M2-Osteosarkomzellen mittels MTT, DNA-Quantifizierung und Mikroskopie nachgewiesen werden.

Zusätzlich konnte mittels des VisiSens-Systems eine dosisabhängige Oxygenierung 48 Stunden nach aKA-Exposition gezeigt werden. Mit steigender Dosis sinkt die metabolische Aktivität und weniger Sauerstoff kann metabolisiert werden.

2. *In vivo*-Versuch

2.1. Allgemeiner Versuchsablauf

2.1.1. Zustand Mäuse

Insgesamt verlief der Versuch reibungslos und ohne große Zwischenfälle. Die Mäuse waren über die gesamte Versuchslaufzeit in einem guten Allgemeinzustand ohne Lahmheiten oder Atemprobleme. Bei keiner Maus wurden die Abbruchkriterien des Scoresheets erreicht. Initial kam es bei sechs Mäusen zu einer Luftembolie nach Injektion der Matrigel-Zellsuspension. Dies konnte nach Optimierung der Injektionsmethode (beschrieben in Kapitel 2.2.6) bei den folgenden Tieren jedoch umgangen werden. Drei Mäuse der 10 mM-Gruppe entwickelten während der 14-tägigen Behandlungsphase eine bilaterale postaurikuläre Alopezie ohne Pruritus (siehe Abbildung 21).

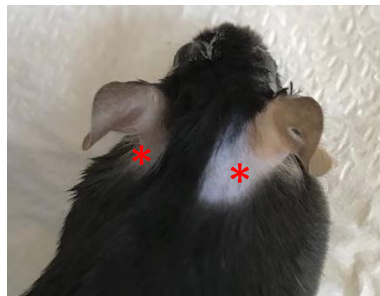


Abbildung 21: Bilaterale postaurikuläre Alopezie (*) bei einer Maus der 10 mM-aKA-Gruppe. mM= millimolar, aKA= aromatisches Kohlenwasserstoff-Amphiphil.

2.1.2. Gewichtsentwicklung

Das initiale Gewicht der 70 Mäuse an Tag 0 betrug $25,16 \pm 1,14$ g und stieg auf $28,29 \pm 0,75$ g an Tag 50. Die Standardabweichungen wurden aus Übersichtsgründen nicht in die Abbildung 22 mit aufgenommen. Diese variierten zwischen 0,105 g ($\pm 0,39$ %) und 3,53 g ($\pm 3,53$ %). Alle Mäuse nahmen über die Gesamtlaufzeit an Gewicht zu. Kurzzeitige und geringgradige Gewichtsabnahmen konnten während der 14-tägigen Behandlungsphase beobachtet werden (Abbildung 22). Dies ist wahrscheinlich auf die tägliche Isoflurananästhesie zurückzuführen.

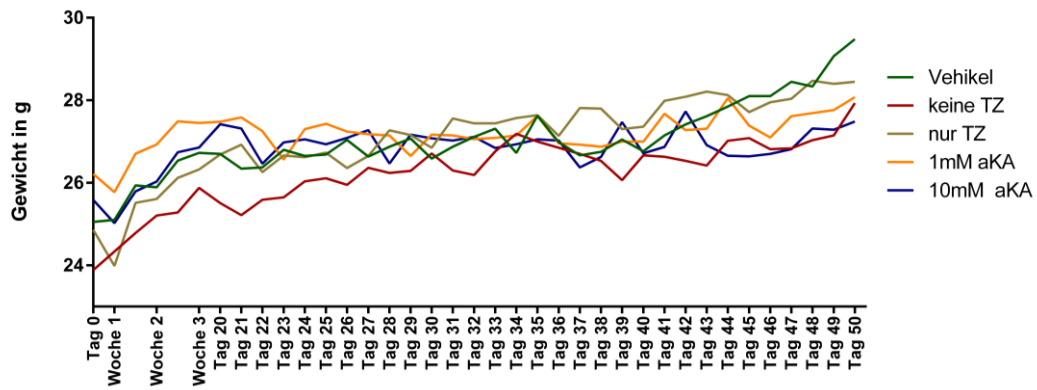


Abbildung 22 : Gewichtsentwicklung aller Versuchsgruppen im zeitlichen Verlauf. Der Graph zeigt die Mittelwerte der Versuchsgruppen. TZ = Tumorzellen, mM= millimolar.

Abbildung 23 stellt das Gewicht der fünf Versuchsgruppen zu den fünf Zeitpunkten gegenüber, Tabelle 20 beinhaltet die Werte der deskriptiven Statistik. Die Mausgruppe keine Tumorzellen (TZ) wies an den ersten drei Zeitpunkten das geringste Gewicht auf. An Tag 35 traf dies auf die 10 mM-Gruppe zu, ebenso wie an Tag 50. Die 1 mM-Gruppe wog zu Tag 0, Tag 20 und Tag 21 am meisten. An Tag 35 war dies bei der Vehikel-Gruppe und an Tag 50 ebenfalls bei der Vehikel-Gruppe der Fall.

Signifikante Unterschiede fanden sich an Tag 0 zwischen der weniger wiegenden keine Tumorzellen-Gruppe und 1 mM-Gruppe ($p < 0,0001$), sowie zwischen keine Tumorzellen- und der mehr wiegenden 10 mM-Gruppe ($p = 0,0014$). Die 10 mM-Gruppe wog auch im Vergleich zur nur Tumorzellen-Gruppe signifikant mehr ($p = 0,029$). Das Gewicht der Vehikel-Gruppe lag knapp hinter der 10 mM-Gruppe.

An Tag 20 wogen die Mäuse der keine Tumorzellengruppe signifikant weniger als die der 1 mM- bzw. 10 mM-Gruppe ($p = 0,0038$ bzw. $p = 0,0031$). Vehikel- und nur Tumorzellen-Gruppe rangieren im Mittelfeld. Zum Zeitpunkt Tag 21 wogen die Tiere der keine Tumorzellen-Gruppe immer noch signifikant weniger als diese der 1 mM-Gruppe ($p = 0,0024$) und der 10 mM-Gruppe ($p = 0,0049$). Vehikel- und nur Tumorzellen-Gruppe liegen weiterhin in der Mitte. Am Tag 35 lagen keinerlei signifikante Unterschiede vor. Auf die am wenigsten wiegende 10 mM-Gruppe folgte die keine Tumorzellen-Gruppe, die nur Tumorzellen-Gruppe sowie die 1 mM-Gruppe.

Zum Versuchsende Tag 50 bestanden signifikante Unterschiede zwischen der schwereren Vehikelgruppe und der 10 mM-Gruppe ($p = 0,0044$). Schwerer als die

10 mM-Gruppe waren in aufsteigender Reihenfolge die 1 mM-Gruppe, die nur Tumorzellen-Gruppe und die keine Tumorzellen-Gruppe.

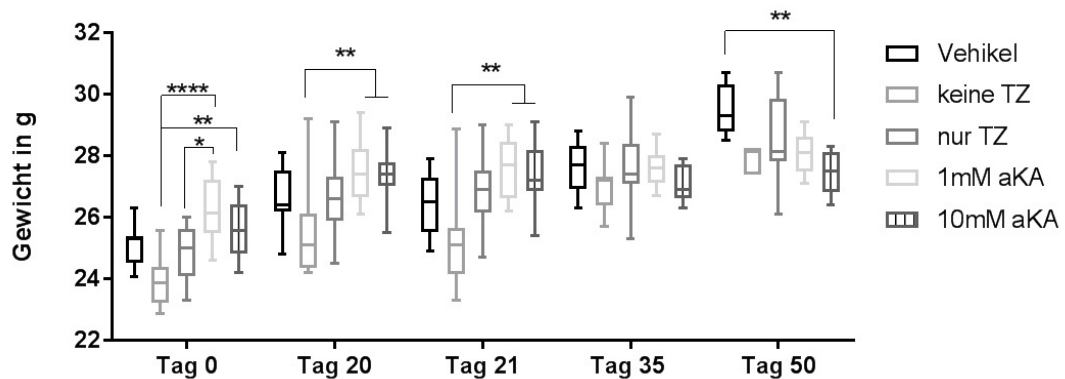


Abbildung 23 : Gewichte aller Versuchsgruppen zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Abbildung zeigt die Maximal- und Minimalwerte, sowie 25 %-, 75 %-Perzentil und Medianwerte. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test kombiniert mit multiplen Vergleichstests nach Dunn. Signifikanzlevel wurden wie folgt gekennzeichnet: $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**) und $p < 0,0001$ (****). TZ = Tumorzellen, mM= millimolar, aKA= aromatisches Kohlenwasserstoff-Amphiphil.

Tabelle 20: Deskriptive Statistik der Gewichtsergebnisse

Vehikel	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	25,29 g	24,53 g	25,40 g
Tag 20	26,40 g	26,20 g	27,50 g
Tag 21	26,50g	25,50 g	27,30 g
Tag 35	27,70 g	26,93 g	28,30 g
Tag 50	29,30 g	28,80 g	30,33 g
Keine Tumorzellen	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	23,86 g	23,21 g	24,38 g
Tag 20	25,10 g	24,35 g	26,13 g
Tag 21	25,10 g	24,15 g	25,65 g
Tag 35	27,20 g	26,40 g	27,30 g
Tag 50	28,20 g	27,40 g	28,20 g
Nur Tumorzellen	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	25,00 g	24,08 g	25,6 g
Tag 20	26,60 g	25, 90 g	27,30 g
Tag 21	26,90 g	26,15 g	27,50 g
Tag 35	27,40 g	27,08 g	28,40 g
Tag 50	28,15 g	27,83 g	29,85 g
1mM aKA	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	26,15 g	25,48 g	27,23 g
Tag 20	27,40 g	26,65 g	28,23 g
Tag 21	27,70 g	26,63 g	28,45 g
Tag 35	27,60 g	27,13 g	28,03 g
Tag 50	28,10 g	27,48 g	28,63 g

10mM aKA	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	25,55 g	24,80 g	26,43 g
Tag 20	27,40 g	27,00 g	27,80 g
Tag 21	27,20 g	26,85 g	28,20 g
Tag 35	26,90 g	26,60 g	27,70 g
Tag 50	27,50 g	26,80 g	28,10 g

2.1.3. Fazit

Es kann somit festgehalten werden, dass das Tumorwachstum bei keiner der Gruppen zu einem ausgeprägten Gewichtsverlust oder Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens geführt hat. Auch die keine Tumorzellen-Gruppe, der über 14 Tage eine 10 mM-aKA-Dosis appliziert wurde, zeigte keinen Gewichtsverlust oder Einschränkungen des Allgemeinbefindens über die Versuchslaufzeit. Lediglich die bilaterale postaurikuläre Alopezie ohne Pruritus bei drei Mäusen der 10 mM-Gruppe konnte als eventueller nicht-toxischer Nebeneffekt beobachtet werden.

2.1. μ CT-Bildgebung und -Analyse

Insgesamt verlief die μ CT-Bildgebung über die gesamte Versuchslaufzeit ohne größere Probleme. Die Mäuse vertrugen die Isoflurannarkose sehr gut und erwachten sehr schnell nach Expositionsende. Während der täglichen Kurzzeit-Isoflurananästhesie (Tag 20-35) kam es bei wenigen Mäusen zu kurzzeitiger Dyspnoe. Daraufhin wurde die Gasmasken sofort entfernt und die Tiere bis zur vollständigen Erholung auf einer Wärmematte beobachtet.

Bei einer Maus der Vehikelgruppe war der Tumor bereits von außen sehr gut sichtbar (Abbildung 24).



Abbildung 24 : Von außen sichtbarer Tumor an proximaler Tibia (mit rotem Kreis markiert).

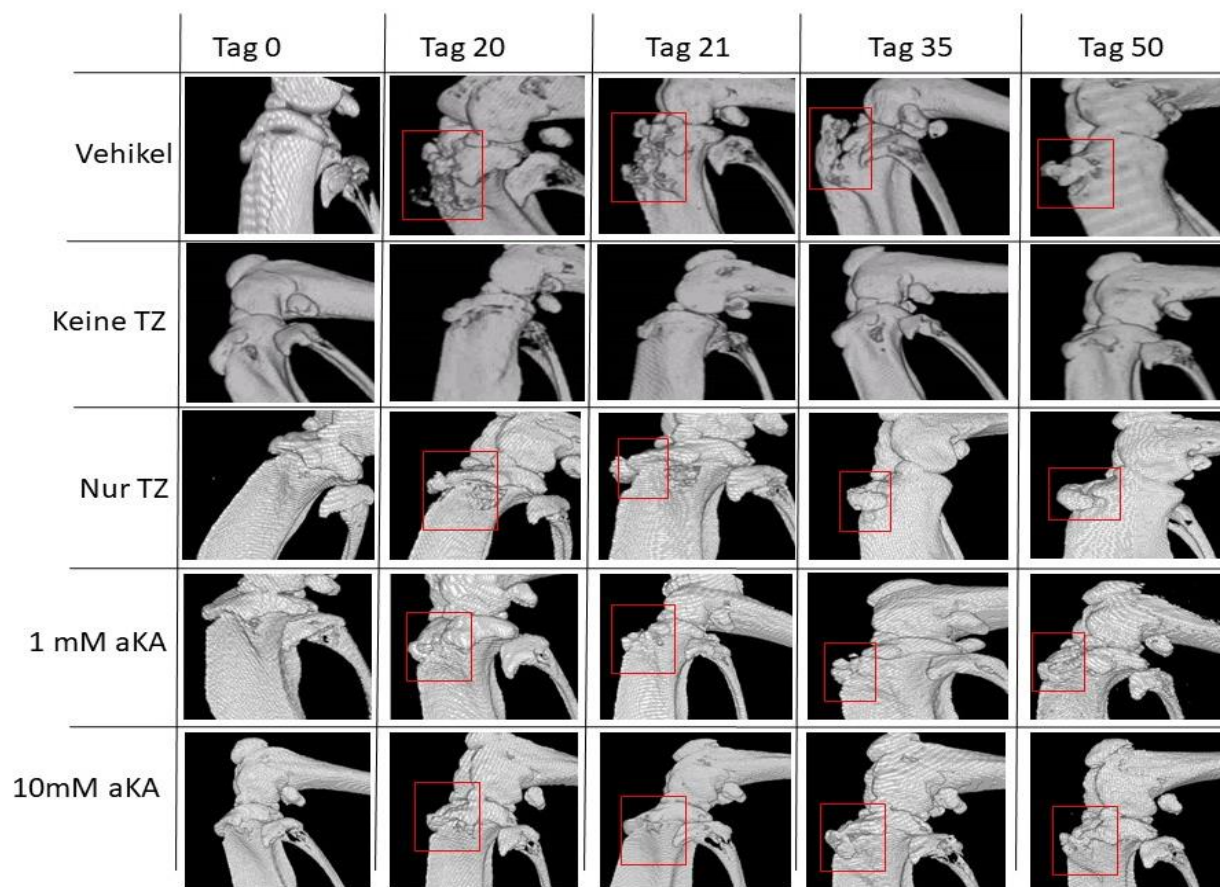


Abbildung 25 : Röntgenologische Dokumentation der Tumorprogression mittels μ CT. Tumoren der proximalen Tibia sind mit rotem Kästchen markiert. Es wurde jeweils der Scan einer repräsentativen Maus pro Gruppe und Zeitpunkt ausgewählt. TZ = Tumorzellen, mM= millimolar, aKA= aromatisches Kohlenwasserstoffamphiphil.

Abbildung 25 zeigt eine Übersicht der Tumorprogression bei allen fünf Versuchsgruppen zu allen Zeitpunkten. Die Bildausschnitte zeigen das Kniegelenk inklusive distalem Femur und proximaler Tibia sowie proximaler Fibula. An Tag 0 aller Gruppen und allen Zeitpunkten der keine Tumorzellen-Gruppe ist keinerlei Tumorwachstum zu erkennen. Die Maus mit dem ausgeprägtesten Tumorwachstum gehörte der Vehikel-Gruppe an. Zwischen der nur Tumorzellen-, 1 mM- und 10 mM-Gruppe ist mit bloßem Auge kein merklicher Unterschied auszumachen. Die typischen periostalen Knochenzubildungen sind durch rote Kästchen markiert.

In Abbildung 26 ist analog zu Abbildung 27 eine Übersicht der Lungen- μ CT-Scans bei allen fünf Versuchsgruppen zu allen Zeitpunkten zu sehen. Es wurde jeweils das kranio-kaudale Schnittbild mit der größten Lungenanschnittfläche gewählt. Zu keinem Zeitpunkt konnten anhand dieser μ CT-Bilder Metastasen detektiert werden. Die Pleura lag überall der Thoraxwand an und wies keine Verdickungen oder Flüssigkeitsansammlungen auf. Es zeigte sich ein physiologisches Lungenparenchym und die Lungen waren beidseits frei belüftet. Die Bronchien waren frei einsehbar.

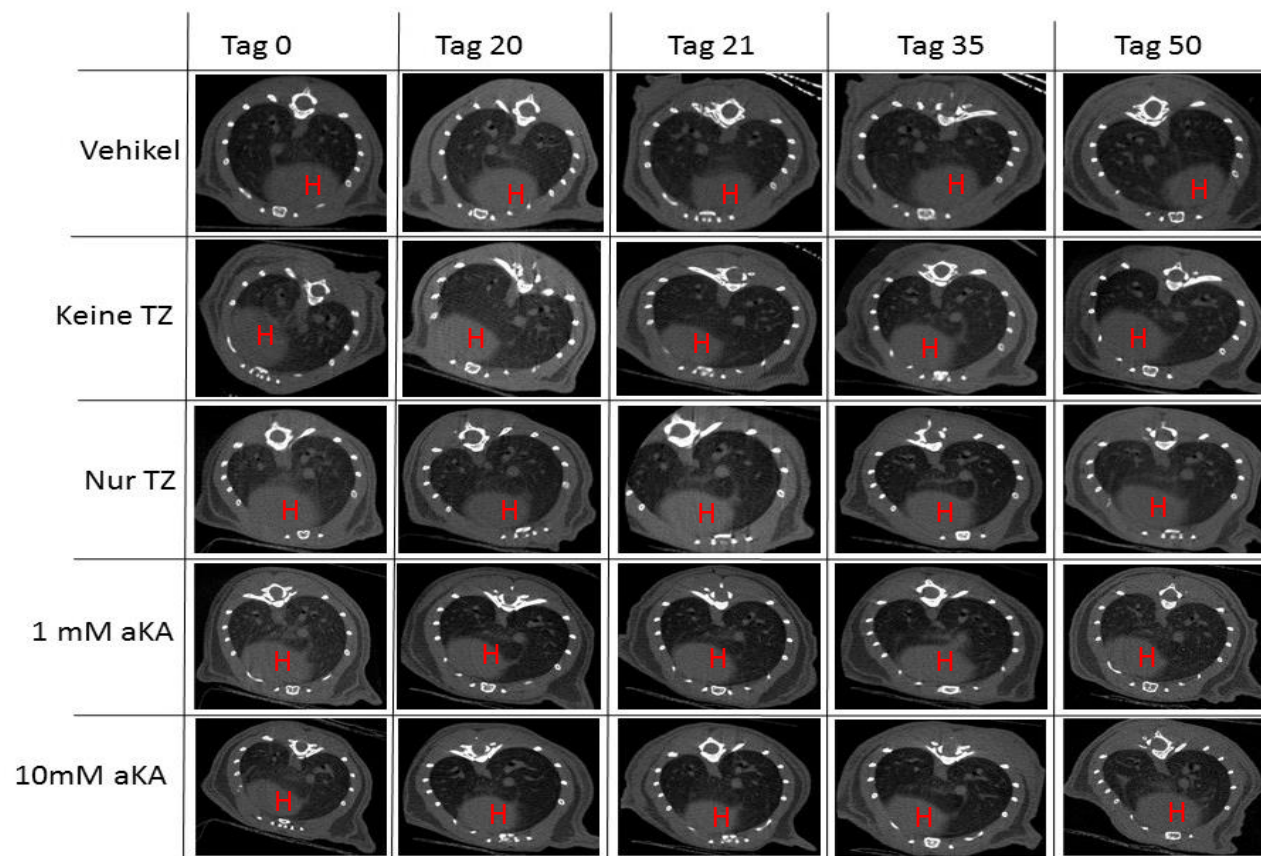


Abbildung 26 : Röntgenologische Dokumentation des pulmonalen Metastasierungsstatus mittels μ CT. H markiert das Herz. Es wurde jeweils der Scan einer repräsentativen Maus pro Gruppe und Zeitpunkt ausgewählt. TZ = Tumorzellen, mM= millimolar, aKA= aromatisches Kohlenwasserstoff-Amphiphil.

2.1.1. Gesamtgewebevolumen (TV)

Abbildung 27 zeigt eine Übersicht des Gesamtgewebevolumens und Tabelle 21 die zugehörige deskriptive Statistik. Die Werte des Tages 0 der Vehikel-Gruppe waren signifikant höher als die der nur Tumorzellen-Gruppe ($p=0,0047$). Dies traf ebenfalls auf den Vergleich zwischen Vehikel-Gruppe und 1 mM- ($p=0,0035$) bzw. 10 mM-Gruppe zu ($p=0,0002$). Das Gesamtgewebevolumen der 10 mM-Gruppe war zudem signifikant kleiner als jenes der keine Tumorzellen-Gruppe ($p=0,0392$). An Tag 20 bestanden keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den fünf Gruppen. Die Vehikel-Gruppe zeigte die niedrigsten Werte. Darauf folgten aufsteigend die keine Tumorzellen-Gruppe, die 10 mM-Gruppe und die nur Tumorzellen-Gruppe. Das größte Gesamtgewebevolumen fand sich bei der 1 mM-Gruppe. Zum Zeitpunkt Tag 21 waren weiterhin keine signifikanten Differenzen im Vergleich zu finden. Das niedrigste Gesamtgewebevolumen wies weiterhin die 10 mM-Gruppe auf. Darauf folgten in aufsteigender Reihenfolge die keine Tumorzellen-Gruppe, nur Tumorzellen-Gruppe und Vehikel-Gruppe. Die 1 mM-Gruppe erreichte auch zu diesem Zeitpunkt die höchsten Werte. Nach Ende der 14-tägigen Applikation an Tag 35 fiel auf, dass nun die nur Tumorzellen-Gruppe das geringste Volumen aufwies. Die Gruppe ohne Tumorzellen, Vehikel-Gruppe und 1 mM-Gruppe lagen relativ dicht beieinander. Das Gesamtgewebevolumen der 10 mM-Gruppe war das zu diesem Zeitpunkt größte. Es bestanden keinerlei signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Dies war erst an Tag 50 beim Vergleich von Vehikel- und keine Tumorzellen-Gruppe auf ($p=0,0099$). Letztere wies das geringste Gesamtgewebevolumen auf. Darauf folgten die nur Tumorzellen-Gruppe, 1 mM-Gruppe und 10 mM-Gruppe.

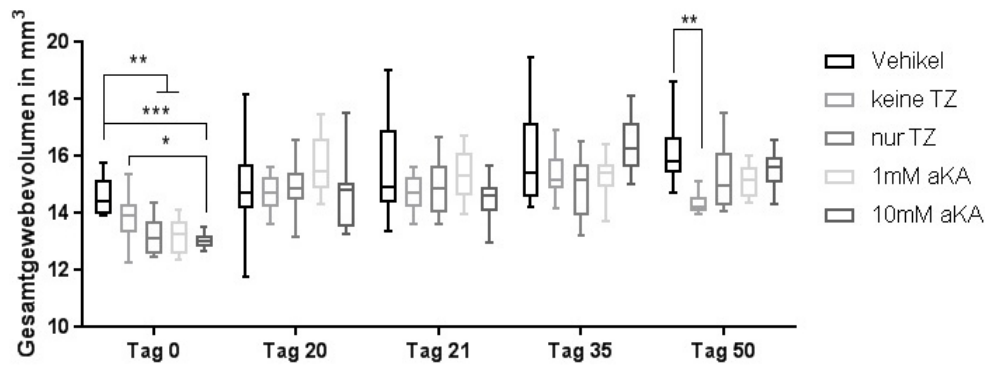


Abbildung 27: Übersicht über das Gesamtgewebevolumen (TV) bei allen Gruppen zu fünf Zeitpunkten. Die Abbildung zeigt die die Maximal- und Minimalwerte, sowie 25 %-, 75 %-Perzentil und Medianwerte. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test kombiniert mit multiplen Vergleichstests nach Dunn. Signifikanzlevel wurden wie folgt gekennzeichnet: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***). TZ = Tumorzellen, mM= millimolar, aKA= aromatisches Kohlenwasserstoff-Amphiphil.

Tabelle 21: Deskriptive Statistik zu den Ergebnissen des Gesamtgewebevolumens

Vehikel	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	14,43 mm ³	13,96 mm ³	15,17 mm ³
Tag 20	14,72 mm ³	14,19 mm ³	15,72 mm ³
Tag 21	14,92 mm ³	14,36 mm ³	16,92 mm ³
Tag 35	15,42 mm ³	14,58 mm ³	17,16 mm ³
Tag 50	15,84 mm ³	15,41 mm ³	16,68 mm ³
Keine Tumorzellen	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	13,91 mm ³	13,35 mm ³	14,32 mm ³
Tag 20	14,73 mm ³	14,21 mm ³	15,28 mm ³
Tag 21	14,73 mm ³	14,21 mm ³	15,28 mm ³
Tag 35	15,17 mm ³	14,85 mm ³	15,95 mm ³
Tag 50	14,23 mm ³	14,09 mm ³	14,57 mm ³
Nur Tumorzellen	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	13,11 mm ³	12,59 mm ³	13,71 mm ³
Tag 20	14,89 mm ³	14,46 mm ³	15,44 mm ³
Tag 21	14,92 mm ³	14,08 mm ³	15,80 mm ³
Tag 35	15,15 mm ³	13,91 mm ³	15,71 mm ³
Tag 50	14,98 mm ³	14,25 mm ³	16,12 mm ³
1mM aKA	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	13,30 mm ³	12,59 mm ³	13,70 mm ³
Tag 20	15,46 mm ³	14,88 mm ³	16,64 mm ³
Tag 21	15,31 mm ³	14,64 mm ³	16,14 mm ³
Tag 35	15,44 mm ³	14,92 mm ³	15,71 mm ³
Tag 50	15,20 mm ³	14,58 mm ³	15,61 mm ³
10mM aKA	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	13,04 mm ³	12,82 mm ³	13,24 mm ³
Tag 20	14,83 mm ³	13,53 mm ³	15,08 mm ³
Tag 21	14,60 mm ³	14,06 mm ³	14,92 mm ³
Tag 35	16,28 mm ³	15,65 mm ³	17,17 mm ³
Tag 50	15,63 mm ³	15,07 mm ³	15,96 mm ³

2.1.2. Totales Knochenvolumen (BV)

Abbildung 28 veranschaulicht die ermittelten Knochenvolumenwerte und Tabelle 22 enthält die zugehörige deskriptive Statistik. Zu Versuchsbeginn lagen die Werte an Tag 0 dicht beieinander, es waren somit keinerlei signifikante Differenzen vorhanden. Das geringste totale Knochenvolumen wies die 10 mM-Gruppe auf. Darauf folgten in aufsteigender Reihenfolge die keine Tumorzellen-Gruppe, die Vehikel-Gruppe sowie die nur Tumorzellen-Gruppe. Über das größte totale Knochenvolumen verfügte an diesem Zeitpunkt die 1 mM-Gruppe. Zum Zeitpunkt Tag 20 bestanden weiterhin keinerlei signifikante Unterschiede. Das geringste totale Knochenvolumen wies immer noch die 10 mM-Gruppe auf. Dicht darauf folgte die keine Tumorzellen-Gruppe, die nur Tumorzellen- und die 1 mM-Gruppe. Das größte Knochenvolumen besaß die Vehikel-Gruppe. An Tag 21 war das geringste totale Knochenvolumen bei der nur Tumorzellen-Gruppe zu finden. Etwas höhere Werte konnte die keine Tumorzellen-Gruppe vorweisen. Es folgten die 10 mM-Gruppe und die 1 mM-Gruppe. Die Vehikel-Gruppe besaß zu diesem Zeitpunkt das größte totale. Die Unterschiede waren wiederum nicht signifikant. Nach Ende der Therapie an Tag 35 war das totale Knochenvolumen der keine Tumorzellen-Gruppe signifikant geringer als das der 1 mM-Gruppe ($p=0,0022$) und der 10 mM-Gruppe ($p < 0,0001$). Außerdem wies die nur Tumorzellen-Gruppe signifikant weniger Knochenvolumen auf als die 10 mM-Gruppe ($p=0,0134$). Die Vehikel-Gruppe verfügte über ein höheres totales Knochenvolumen als die keine Tumorzellen-Gruppe und lag unter den Werten der restlichen Gruppen. An Tag 50 fanden sich keine signifikanten Unterschiede mehr, dennoch wies die keine Tumorzellen-Gruppe weiterhin das geringste totale Knochenvolumen auf. Darauf folgten aufsteigend die 10 mM-, die 1 mM-Gruppe sowie die nur Tumorzellen-Gruppe. Das höchste totale Knochenvolumen fand sich bei der Vehikel-Gruppe.

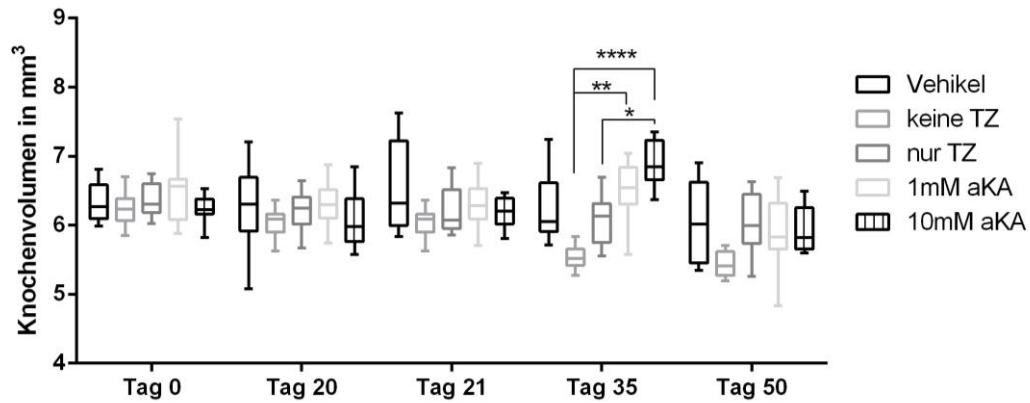


Abbildung 28: Das totale Knochenvolumen verglichen innerhalb der Gruppen an unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Abbildung zeigt die Maximal- und Minimalwerte, sowie 25 %, 75 %-Perzentil und Medianwerte. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test kombiniert mit multiplen Vergleichstests nach Dunn. Signifikanzlevel wurden wie folgt gekennzeichnet: $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**) und $p < 0,0001$ (****). TZ = Tumorzellen, mM= millimolar, aKA= aromatisches Kohlenwasserstoff-Amphiphil.

Tabelle 22: Deskriptive Statistik der Ergebnisse zum totalen Knochenvolumen

Vehikel	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	6,27 mm ³	6,10 mm ³	6,59 mm ³
Tag 20	6,30 mm ³	5,02 mm ³	6,70 mm ³
Tag 21	6,32 mm ³	6,00 mm ³	6,32 mm ³
Tag 35	6,06 mm ³	5,91 mm ³	6,61 mm ³
Tag 50	6,02 mm ³	5,45 mm ³	6,62 mm ³
Keine Tumorzellen	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	6,23 mm ³	6,07 mm ³	6,39 mm ³
Tag 20	6,10 mm ³	5,90 mm ³	6,16 mm ³
Tag 21	6,09 mm ³	5,90 mm ³	6,17 mm ³
Tag 35	5,52 mm ³	5,42 mm ³	5,66 mm ³
Tag 50	5,41 mm ³	5,27 mm ³	5,62 mm ³
Nur Tumorzellen	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	6,31 mm ³	6,18 mm ³	6,60 mm ³
Tag 20	6,25 mm ³	6,02 mm ³	6,41 mm ³
Tag 21	6,07 mm ³	5,95 mm ³	6,52 mm ³
Tag 35	6,13 mm ³	5,75 mm ³	6,31 mm ³
Tag 50	5,60 mm ³	5,74 mm ³	6,45 mm ³
1mM aKA	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	6,56 mm ³	6,08 mm ³	6,67 mm ³
Tag 20	6,30 mm ³	6,10 mm ³	6,52 mm ³
Tag 21	6,28 mm ³	6,09 mm ³	6,53 mm ³
Tag 35	6,55 mm ³	6,30 mm ³	6,84 mm ³
Tag 50	5,83 mm ³	5,66 mm ³	6,32 mm ³
10mM aKA	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	6,23 mm ³	6,16 mm ³	6,38 mm ³
Tag 20	5,98 mm ³	5,76 mm ³	6,38 mm ³
Tag 21	6,20 mm ³	6,02 mm ³	6,39 mm ³
Tag 35	6,85 mm ³	6,66 mm ³	7,23 mm ³
Tag 50	5,82 mm ³	5,65 mm ³	6,25 mm ³

2.1.3. Verhältnis Knochenvolumen zu Gesamtgewebenvolumen (BV/TV %)

Abbildung 29 verdeutlicht die Ergebnisse zum Verhältnis von Knochenvolumen zu Gesamtgewebenvolumen und Tabelle 23 zeigt die Werte der deskriptiven Statistik. Die Werte der Vehikel-Gruppe an Tag 0 waren signifikant niedriger als diese der nur Tumorzellen-Gruppe ($p=0,0124$), der 1 mM-Gruppe ($p=0,0005$) und der 10 mM-Gruppe. Die im Vergleich zur Vehikel-Gruppe höheren Werte der keine Tumorzellen-Gruppe waren signifikant niedriger als diese der 1 mM-Gruppe ($p=0,0026$). An Tag 20 fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die niedrigsten Werte wies die 1 mM-Gruppe auf. Darauf folgte die keine Tumorzellen-, die Vehikel-Gruppe sowie die nur 10 mM-Gruppe. Über den größten Wert verfügte die nur Tumorzellen-Gruppe. Zum Zeitpunkt Tag 21 bestanden weiter keine signifikanten Unterschiede. Über den geringsten Prozentsatz verfügte die keine Tumorzellen-Gruppen. Es folgten die 1 mM-Gruppe, die nur Tumorzellen-Gruppe und die Vehikel-Gruppe. Den größten Wert wies die 10 mM-Gruppe auf. An Tag 35 verfügte die keine Tumorzellen-Gruppe über einen signifikant niedrigeren Wert als die nur Tumorzellen- ($p=0,0446$), die 1 mM-Gruppe ($p=0,0008$) und 10 mM-Gruppe ($p=0,0002$). Die Vehikel-Gruppe besaß einen höheren Wert als die keine Tumorzellen-Gruppe, sowie einen geringeren Wert als die nur Tumorzellen-, 1 mM- und 10 mM-Gruppe. Zum Zeitpunkt Tag 50 waren keine signifikanten Unterschiede mehr zu finden. Die Vehikel-Gruppe verfügte über den geringsten Wert, dicht gefolgt von der 10 mM-Gruppe. Im Mittelfeld befinden sich die keine Tumorzellen- und 1 mM-Gruppe. Den höchsten Wert besaß die nur Tumorzellen-Gruppe.

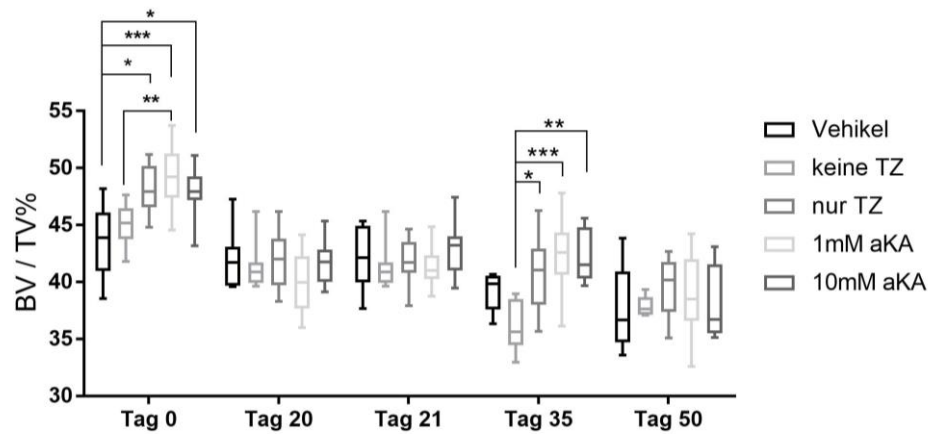


Abbildung 29: Übersicht über das Verhältnis von Gesamtgewebevolumen zu Knochenvolumen im Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Abbildung zeigt die Maximal- und Minimalwerte, sowie 25 %, 75 %-Perzentil und Medianwerte. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test kombiniert mit multiplen Vergleichstests nach Dunn. Signifikanzlevel wurden wie folgt gekennzeichnet: $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***). BV= Bone volume, TV= tissue volume, TZ = Tumorzellen, mM= millimolar, aKA= aromatisches Kohlenwasserstoff-Amphiphil.

Tabelle 23: Deskriptive Statistik zu Ergebnissen TV/BV %

Vehikel	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	43,87 %	40,97 %	46,08 %
Tag 20	41,70 %	39,65 %	43,10 %
Tag 21	42,12 %	39,98 %	44,91 %
Tag 35	39,82 %	37,57 %	40,53 %
Tag 50	36,67 %	34,72 %	40,93 %
Keine Tumorzellen	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	45,17 %	43,75 %	46,47 %
Tag 20	40,86 %	39,93 %	41,69 %
Tag 21	40,86 %	39,93 %	41,69 %
Tag 35	35,64 %	34,44 %	38,50 %
Tag 50	37,64 %	37,13 %	38,69 %
Nur Tumorzellen	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	47,92 %	46,51 %	50,20 %
Tag 20	42,02 %	39,69 %	43,81 %
Tag 21	41,33 %	39,71 %	43,49 %
Tag 35	41,04 %	37,98 %	42,92 %
Tag 50	40,18 %	37,36 %	42,67 %
1mM aKA	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	49,22 %	47,38 %	51,27 %
Tag 20	39,96 %	37,69 %	42,24 %
Tag 21	40,98 %	40,27 %	42,33 %
Tag 35	42,60 %	40,63 %	44,31 %
Tag 50	38,51 %	36,58 %	41,99 %
10mM aKA	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	47,92 %	47,17 %	49,27 %
Tag 20	41,75 %	39,99 %	42,84 %
Tag 21	43,20 %	41,01 %	44,00 %
Tag 35	41,48 %	40,28 %	44,78 %
Tag 50	36,72 %	35,51 %	41,54 %

2.1.4. Knochenmineraldichte (BMD)

Abbildung 30 zeigt die Übersicht der Knochenmineraldichte-Ergebnisse und Tabelle 24 die zugehörigen Werte der deskriptiven Statistik. Zu Beginn des Versuchs an Tag 0 wies die 1 mM-Gruppe signifikant höhere Werte als die keine Tumorzellen-Gruppe auf ($p < 0,0001$). Dies traf ebenfalls auf den Vergleich von 1 mM- und nur Tumorzellen-Gruppe. Ebenso verfügte die 1 mM-Gruppe über eine signifikant höhere Knochenmineraldichte als die Vehikel-Gruppe ($p = 0,0003$). Die Vehikel-Gruppe wies zudem signifikant geringere Werte als die 10 mM-Gruppe auf ($p = 0,0108$). Die keine Tumorzellen-Gruppe zeigte im Gesamtvergleich die kleinsten Knochenmineraldichtewerte auf. Diese waren signifikant geringer als diese der 10 mM-Gruppe ($p = 0,0005$). Zum Zeitpunkt Tag 20 konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Den niedrigsten Wert zeigt die 10 mM-Gruppe. Es folgen in aufsteigender Reihenfolge die nur Tumorzellen-Gruppe und die 1 mM-Gruppe, sowie die Vehikel-Gruppe. Die größte Knochenmineraldichte findet sich bei der Gruppe ohne Tumorzellen. An Tag 21 ist die Knochenmineraldichte bei der keine Tumorzellen-Gruppe signifikant höher im Vergleich zur nur Tumorzellen-Gruppe ($p = 0,0399$). Die 10 mM-Gruppe hatte insgesamt an diesem Zeitpunkt den geringsten Wert. Es folgen mit aufsteigenden Werten die nur Tumorzellen-Gruppe, die 1 mM-Gruppe und die Vehikel-Gruppe. Nach Ende der Therapie an Tag 35 wies die keine Tumorzellen-Gruppe die kleinste Knochenmineraldichte auf, die signifikant geringer als die der 1 mM-Gruppe war ($p = 0,0006$). Die BMD der keine Tumorzellen-Gruppe war zusätzlich signifikant kleiner als jene der 10 mM-Gruppe ($p = 0,0003$). Die Vehikel-Gruppe besaß größere Werte als die keine Tumorzellen-Gruppe und kleinere als die der restlichen Gruppen. Am Versuchsende (Tag 50) ist die Knochenmineraldichte der Vehikel-Gruppe signifikant niedriger als jene der 1 mM-Gruppe ($p = 0,0434$). Dies trifft ebenso auf den Vergleich von Vehikel- und 10 mM-Gruppe zu ($p = 0,0334$). Die Gruppe ohne Tumorzellen verfügt ebenfalls über eine signifikant kleinere Knochenmineraldichte im Vergleich zur 1 mM- ($p = 0,0028$) und 10 mM-Gruppe ($p = 0,022$). Die Knochenmineraldichte der nur Tumorzellen-Gruppe ist niedriger als die der Vehikel- und keine Tumorzellen-Gruppe und höher als die der aKA-Gruppen.

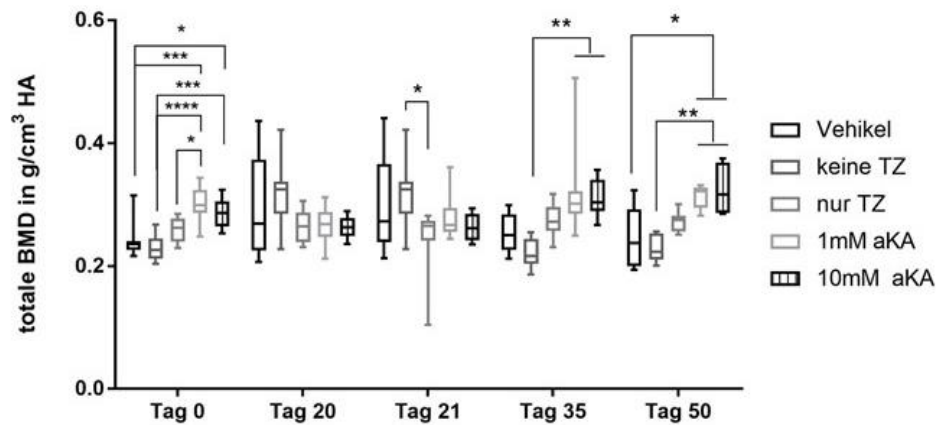


Abbildung 30: Überblick über Knochenmineraldichte der fünf Versuchsgruppen zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Abbildung zeigt die Maximal- und Minimalwerte, sowie 25 %, 75 %-Perzentil und Medianwerte. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test kombiniert mit multiplen Vergleichstests nach Dunn. Signifikanzlevel wurden wie folgt gekennzeichnet: $p < 0,05$ (*); $p < 0,005$ (**) und $p < 0,001$ (***). aKA= aromatisches Kohlenwasserstoff-Amphiphil, HA= Hydroxyapatit, mM= millimolar, TZ = Tumorzellen.

Tabelle 24: Deskriptive Statistik der Knochenmineraldichte-Ergebnisse

Vehikel	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	0,24 g/cm ³ HA	0,23 g/cm ³ HA	0,24 g/cm ³ HA
Tag 20	0,27 g/cm ³ HA	0,23 g/cm ³ HA	0,37 g/cm ³ HA
Tag 21	0,27 g/cm ³ HA	0,24 g/cm ³ HA	0,37 g/cm ³ HA
Tag 35	0,25 g/cm ³ HA	0,23 g/cm ³ HA	0,28 g/cm ³ HA
Tag 50	0,24 g/cm ³ HA	0,20 g/cm ³ HA	0,29 g/cm ³ HA
Keine Tumorzellen	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	0,23 g/cm ³ HA	0,21 g/cm ³ HA	0,24 g/cm ³ HA
Tag 20	0,32 g/cm ³ HA	0,28 g/cm ³ HA	0,34 g/cm ³ HA
Tag 21	0,32 g/cm ³ HA	0,28 g/cm ³ HA	0,33 g/cm ³ HA
Tag 35	0,22 g/cm ³ HA	0,20 g/cm ³ HA	0,24 g/cm ³ HA
Tag 50	0,22 g/cm ³ HA	0,21 g/cm ³ HA	0,25 g/cm ³ HA
Nur Tumorzellen	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	0,26 g/cm ³ HA	0,24 g/cm ³ HA	0,28 g/cm ³ HA
Tag 20	0,26 g/cm ³ HA	0,24 g/cm ³ HA	0,29 g/cm ³ HA
Tag 21	0,27 g/cm ³ HA	0,24 g/cm ³ HA	0,27 g/cm ³ HA
Tag 35	0,27 g/cm ³ HA	0,26 g/cm ³ HA	0,30 g/cm ³ HA
Tag 50	0,27 g/cm ³ HA	0,26 g/cm ³ HA	0,28 g/cm ³ HA
1mM aKA	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	0,30 g/cm ³ HA	0,29 g/cm ³ HA	0,32 g/cm ³ HA
Tag 20	0,27 g/cm ³ HA	0,25 g/cm ³ HA	0,29 g/cm ³ HA
Tag 21	0,27 g/cm ³ HA	0,26 g/cm ³ HA	0,29 g/cm ³ HA
Tag 35	0,30 g/cm ³ HA	0,28 g/cm ³ HA	0,32 g/cm ³ HA
Tag 50	0,32 g/cm ³ HA	0,29 g/cm ³ HA	0,33 g/cm ³ HA
10mM aKA	Median	25% Perzentil	75% Perzentil
Tag 0	0,29 g/cm ³ HA	0,26 g/cm ³ HA	0,30 g/cm ³ HA
Tag 20	0,26 g/cm ³ HA	0,25 g/cm ³ HA	0,28 g/cm ³ HA
Tag 21	0,26 g/cm ³ HA	0,24 g/cm ³ HA	0,28 g/cm ³ HA
Tag 35	0,30 g/cm ³ HA	0,29 g/cm ³ HA	0,34 g/cm ³ HA
Tag 50	0,17 g/cm ³ HA	0,29 g/cm ³ HA	0,37 g/cm ³ HA

2.1.5. Fazit

Hinsichtlich der ersten Frage, ob signifikante Unterschiede bezüglich der Tumorprogedienz zwischen behandelten und unbehandelten Tieren bestehen, kann ganz klar mit Ja beantwortet werden. Das totale Knochenvolumen unterschied sich signifikant zwischen behandelten (1 mM- bzw. 10 mM-Gruppe) und unbehandelten (nur Tumorzellen-Gruppe) Tieren. Diese stellten sich an Tag 35 zunächst konträr der Erwartung dar, da die unbehandelten Tiere ein signifikant kleineres totales Knochenvolumen aufwiesen als die 10 mM aKA behandelte Gruppe. Auch die mit der 1 mM Dosis behandelten Tiere zeigten zu diesem Zeitpunkt ein höheres totales Knochenvolumen, diese Differenz ist jedoch nicht statistisch signifikant. Zum Endzeitpunkt Tag 50 stellte sich die Lage invers dar. Nun zeigte sich ein dosisabhängiger, nicht signifikanter Effekt, sodass die unbehandelte nur Tumorzellen-Gruppe das größte totale Knochenvolumen besaß, während das Knochenvolumen der 1 mM-Gruppe um 2,75% und das der 10 mM-Gruppe um 2,88% kleiner war. Zudem lies sich ein dosisabhängiger Trend ebenfalls bei der Knochenmineraldichte an Tag 35 beobachten. Hier wies die 1 mM-Gruppe einen um 10,7% höheren Wert und die 10 mM-Gruppe einen 11,5% höheren Wert auf. Der Unterschied zwischen unbehandelten und mit 10 mM aKA behandelten Tieren war statistisch signifikant.

Die zweite Frage, ob die Behandlung mit dem aKA kurativ ist oder ob die Tumoren nach Ende der Applikation wieder in verstärktem Ausmaß proliferieren, kann mit Nein beantwortet werden. Zum Zeitpunkt Tag 0 war das totale Knochenvolumen der nur Tumorzellen-Gruppe um 4,1% kleiner als jenes der 1mM-Gruppe und um 1,2% größer als das der 10 mM-Gruppe. 35 Tage später verzeichnete das totale Knochenvolumen der 1 mM-Gruppe ein Plus von 6,7% und die 10 mM-Gruppe einen 11,6%-igen Unterschied gegenüber der unbehandelten Gruppe. Zum Versuchsende an Tag 50 betrug die Differenz zwischen nur Tumorzellen-Gruppe und 1 mM-Gruppe -2,8% und zwischen nur Tumorzellen-Gruppe und 10 mM-Gruppe -2,9%. Somit schienen an Tag 35 noch reaktive Prozesse im Gange zu sein und die Wirkung des aKA setzte erst später ein. Die Tumoren proliferieren demnach nach Ende der Applikation nicht wieder in verstärktem Ausmaß, das Gegenteil ist der Fall.

2.2. Sauerstoffmessungen intratibial

Der Mittelwert aller gemessener Sauerstoffwerte in der gesunden Tibia (unabhängig von Gruppe und Zeitpunkt) betrug $1,24 \pm 1,31 \text{ \%O}_2$ (n=38).

Abbildung 31 zeigt die Ergebnisse der intratibialen Sauerstoffmessungen vergleichend zwischen den Versuchsgruppen an Tag 50. Die keine Tumorzellen-Gruppe wies die höchsten Sauerstoffwerte auf (Median: $2,15 \text{ \%O}_2$, 25% Perzentil: $0,56 \text{ \%O}_2$, 75% Perzentil: $3,29 \text{ \%O}_2$), gefolgt von der Vehikel-Gruppe (Median: $1,79 \text{ \%O}_2$, 25% Perzentil: $0,64 \text{ \%O}_2$, 75% Perzentil: $2,29 \text{ \%O}_2$), 10 mM-Gruppe (nur ein Messwert von $0,99 \text{ \%O}_2$), 1 mM-Gruppe (Median: $0,70 \text{ \%O}_2$, 25% Perzentil: $0,04 \text{ \%O}_2$, 75% Perzentil: $1,10 \text{ \%O}_2$) und nur Tumorzellen-Gruppe (Median: $0,25 \text{ \%O}_2$, 25% Perzentil: $0,19 \text{ \%O}_2$, 75% Perzentil: $0,94 \text{ \%O}_2$). Es bestanden keinerlei signifikante Unterschiede.

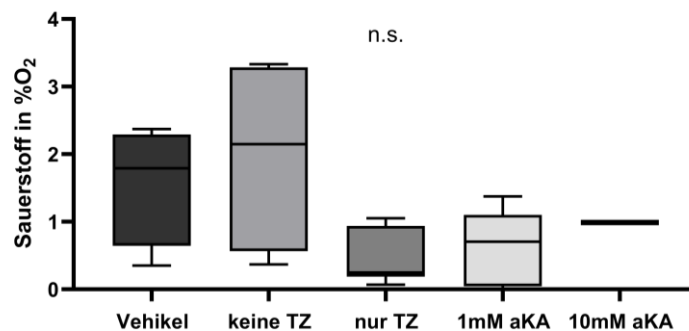


Abbildung 31 : Intratibiale Sauerstoffwerte aufgesplittet nach Versuchsgruppen an Tag 50. Die Abbildung zeigt die die Maximal- und Minimalwerte, sowie 25%-, 75%-Perzentil und Medianwerte. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test kombiniert mit multiplen Vergleichstests nach Dunn. TZ = Tumorzellen, mM= millimolar, aKA= aromatisches Kohlenwasserstoff-Amphiphil. Es konnte keinerlei statistische Signifikanz nachgewiesen werden (n.s. = nicht signifikant).

2.2.1. Fazit

Die intraosseären Sauerstoffwerte bewegten sich im niedrigen einstelligen Bereich. Das aKA verursachte in diesem Versuchsaufbau keine signifikanten Effekte auf die intratibiale Oxygenierung des kontralateralen, gesunden Beines.

2.3. Luminex MagPix

Zunächst sei erwähnt, dass manche Proben (n=164 von gesamt 252) aufgrund zu geringer Plasmavolumina (<15µl) nicht untersucht werden konnten. Daher wurden die Tag 0-Werte aller fünf Gruppen gemittelt. Zu den Zeitpunkten Tag 20 und 21 waren mit Ausnahme der nur Tumorzellen-Gruppe pro Gruppe maximal 2 Plasmaproben (Histologietiere) verfügbar. Dies steht im Zusammenhang mit der Belastung durch die tägliche Isofluran-Exposition im Rahmen der 14-tägigen Behandlung. Die weiter lebenden Tiere sollten nicht noch zusätzlich durch eine Blutentnahme belastet werden. Aus diesem Grund war zu diesen Zeitpunkten (Tag 0, 20 und 21) keine statistische Analyse möglich.

Die Konzentrationen der Analyten IL-6 und TNF-α lagen in den untersuchten murinen Plasmaproben unter der Nachweisgrenze von < 23,7 pg/ml bzw. < 3,54 pg/ml.

Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse der VEGF-Konzentration im murinen Plasma und Tabelle 25 die zugehörige deskriptive Statistik. Der Mittelwert aller VEGF-Plasmaproben an Tag 0 lag bei $2,67 \pm 0,55$ pg/ml. An Tag 20 wies die Vehikel-Gruppe das geringste totale Gewebevolumen auf. Es folgten in aufsteigender Reihenfolge die keine Tumorzellen-Gruppe und die 10 mM-Gruppe. Über das größte Gewebevolumen verfügte die 1 mM-Gruppe. Einen Tag nach Beginn der Behandlung (Tag 21) hatte die Vehikel-Gruppe zusammen mit der nur Tumorzellen-Gruppe den geringsten VEGF-Plasmawert. Etwas höhere Ergebnisse erzielten die 1 mM-Gruppe sowie die 10 mM-Gruppe. An der Spitze lag die keine Tumorzellen-Gruppe mit deutlichem Abstand. Nach Beenden der Therapie (Tag 35) wies die keine Tumorzellen-Gruppe signifikant kleinere Werte als die 10 mM-Gruppe auf ($p=0,0166$). Die Vehikel-Gruppe verfügte über höhere Werte als die keine Tumorzellengruppe und niedrigere im Vergleich zur nur Tumorzellen- und 1 mM-Gruppe. Es ist somit ein dosisabhängiger Effekt zu erkennen: Die Werte nehmen von der unbehandelten Kontrolle (nur Tumorzellen) zur 1 mM- und 10 mM-Dosis relativ gleichmäßig zu. An Tag 50 bestanden keinerlei signifikante Unterschiede mehr. Die VEGF-Plasmawerte der keine Tumorzellen-Gruppe waren am niedrigsten. Darauf folgten die nur Tumorzellen- und Vehikel-Gruppe. Die aKA-Gruppen wiesen die höchsten Werte auf, dabei lag die 10 mM-Gruppe hinter der

1 mM-Gruppe. Der dosisabhängige Trend ist nicht mehr zu erkennen.

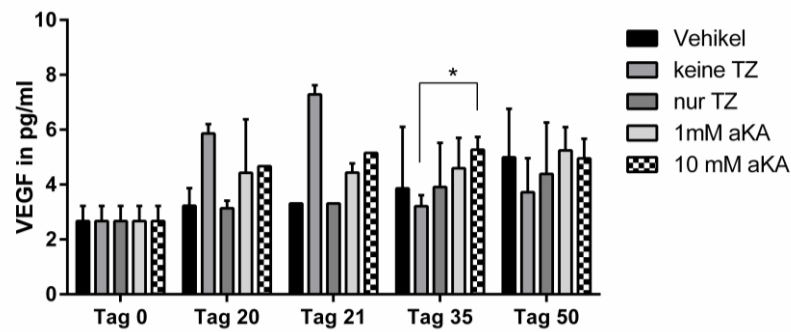


Abbildung 32 : Übersicht VEGF-Konzentration in Plasmaproben zu allen fünf Zeitpunkten. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte inklusive Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test kombiniert mit multiplen Vergleichstests nach Dunn. Signifikanzlevel wurden wie folgt gekennzeichnet: $p < 0,05$ (*). TZ = Tumorzellen, mM= millimolar, aKA= aromatisches Kohlenwasserstoff-Amphiphil, VEGF= vascular endothelial growth factor.

Tabelle 25: Deskriptive Statistik der VEGF-Werte

Vehikel	Mittelwert	Standardabweichung
Tag 20	3,23 pg/ml	±0,64 pg/ml
Tag 21	3,32 pg/ml	±0 pg/ml
Tag 35	3,86 pg/ml	±2,24 pg/ml
Tag 50	4,99 pg/ml	±1,77 pg/ml
Keine Tumorzellen	Mittelwert	Standardabweichung
Tag 20	5,87 pg/ml	±0,34 pg/ml
Tag 21	7,29 pg/ml	±0,33 pg/ml
Tag 35	3,21 pg/ml	±0,40 pg/ml
Tag 50	3,73 pg/ml	±1,24 pg/ml
Nur Tumorzellen	Mittelwert	Standardabweichung
Tag 20	3,14 pg/ml	±0,28 pg/ml
Tag 21	3,32 pg/ml	±0 pg/ml
Tag 35	3,91 pg/ml	±1,61 pg/ml
Tag 50	4,39 pg/ml	±1,88 pg/ml
1mM aKA	Mittelwert	Standardabweichung
Tag 20	4,43 pg/ml	±1,96 pg/ml
Tag 21	4,44 pg/ml	±0,34 pg/ml
Tag 35	4,59 pg/ml	±1,11 pg/ml
Tag 50	5,25 pg/ml	±0,85 pg/ml
10mM aKA	Mittelwert	Standardabweichung
Tag 20	4,67 pg/ml	±0 pg/ml
Tag 21	5,15 pg/ml	±0 pg/ml
Tag 35	5,27 pg/ml	±0,47 pg/ml
Tag 50	4,95 pg/ml	±0,71 pg/ml

2.3.1. Fazit

Da bei keiner der untersuchten Plasmaproben IL-6 und TNF- α nachweisbar war, lag somit bei keiner der untersuchten Mäuse der Hinweis auf eine systemische inflammatorische Reaktion vor. Die VEGF-Konzentration stieg insgesamt bei allen Gruppen, denen Tumorzellen implantiert wurden. An Tag 35 lies sich wie bereits beim totalen Knochenvolumen und der Knochenmineraldichte ein signifikanter dosisabhängiger Effekt beobachten. Die VEGF-Plasmakonzentration der 1 mM-Gruppe überstieg jene der nur Tumorzellen-Gruppe um 17,4%, die Konzentration der 10 mM-Gruppe war sogar um 34,7% höher.

2.4. Histologie

2.4.1. Knochenhistologie

Abbildung 33 veranschaulicht beispielhafte histologische Schnitte der proximalen Tibiaregion jeweils in H.E.- und Masson-Goldner-Trichrom-Färbung. Die oberste Reihe zeigt den physiologischen Zustand von Knochen- und Knorpelgewebe. In Reihe 2, 3 und 4 ist das infiltrative Wachstum und die typische Gewebeformation des Osteosarkoms (trabekuläre Knochenstruktur) gut zu erkennen.

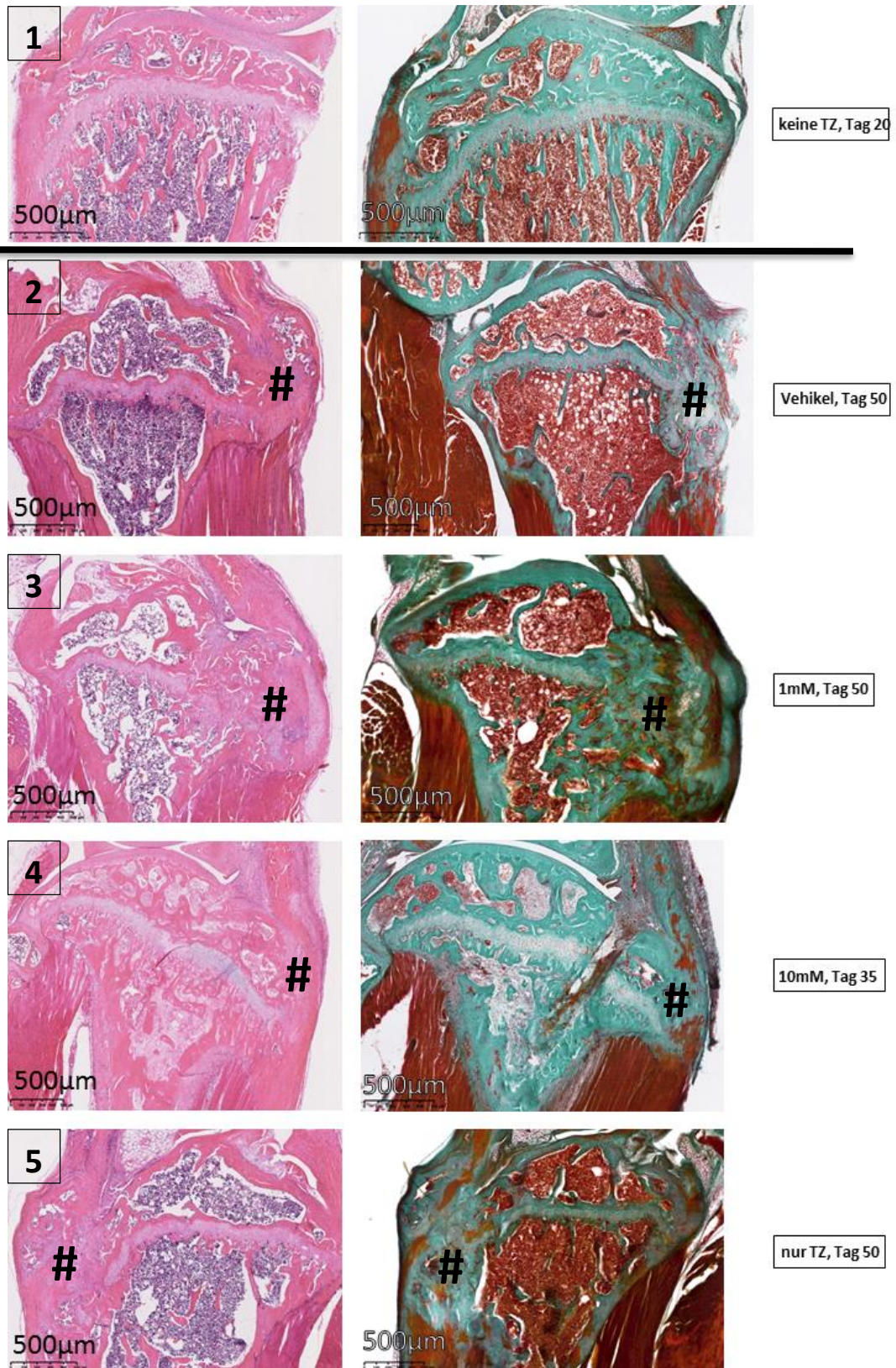


Abbildung 33: Übersicht beispielhafter histologischer Schnitte der proximalen Tibia in H.E.-Färbung (linke Seite) und Masson-Goldner-Trichrom-Färbung (rechte Seite). Die oberste Reihe stellt den physiologischen Zustand dar, während die restlichen Reihen Tibiae mit Osteosarkom (#) zeigen. aKA= aromatisches Kohlenwasserstoff-Amphiphil, TZ= Tumorzellen, mM= millimolar.

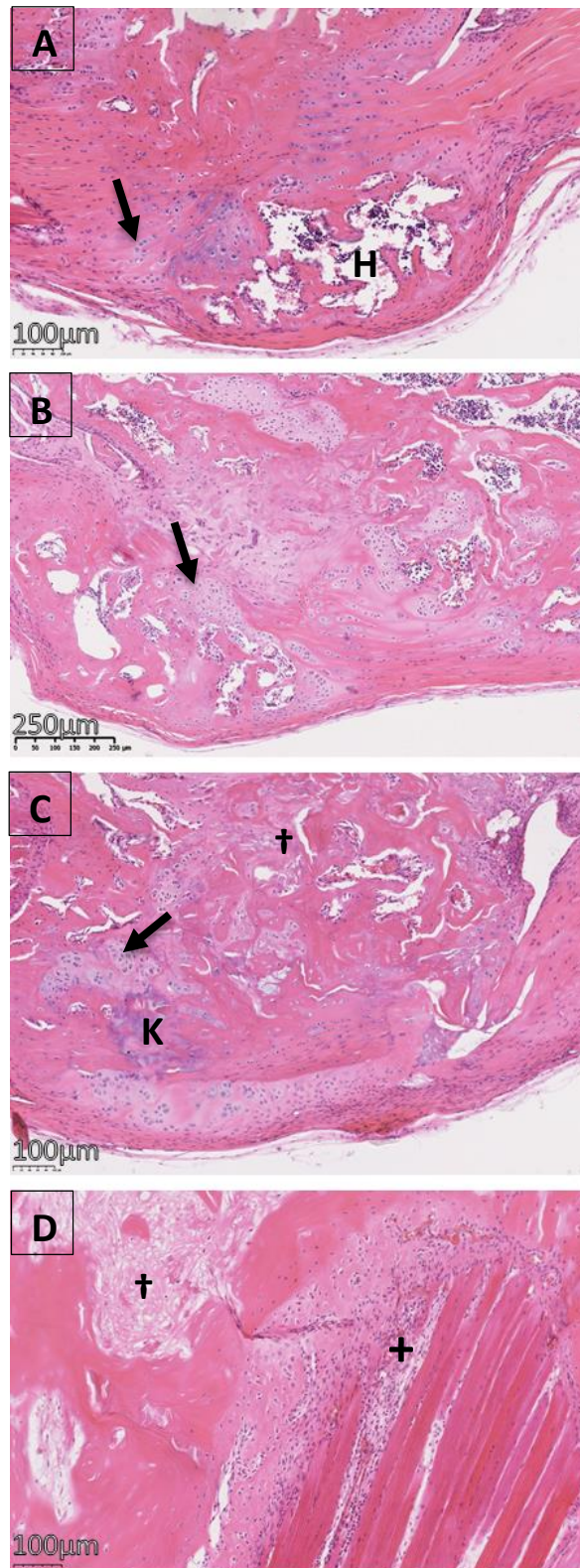
Abbildung 34 zeigt beispielhafte histologische Schnitte (H.E.-Färbung) der Osteosarkome in höherer Vergrößerung. Zu beobachten ist die geringe Differenzierung des Gewebes, die pleomorphen Zellen und die typischen Osteoidbälkchen bei allen tumorzellimplantierten Gruppen. Das gesunde periphere Gewebe wurde invasiv durchwachsen. Auffallend ist eine Vielzahl von Knorpelzellen, die in Osteoid eingebettet sind. Der Tumor besteht aus zwei Komponenten: Chondro- und Osteosarkom. In der Nomenklatur wird jedoch nach dem malignerem Anteil benannt, es handelt sich somit um Osteosarkome.

Die unbehandelte nur Tumorzellen-Gruppe (Abbildung 34, A) zeigt histologisch eine deutliche Gewebedeformation mit vereinzelt Spindelzellformationen, in Osteoid eingelagerte Chondrozyten sowie hyalines, eosinophiles Material.

Bei der Vehikel-Gruppe (Abbildung 34, B) lassen sich ebenfalls die in Osteoid eingelagerte Knorpelzellen beobachten sowie mit Knochenmark gefüllte Hohlräume.

Die Tumoren der mit 1 mM aKA behandelte Gruppe (Abbildung 34, C) zeigen in der histologischen Auswertung verkalktes Osteoid mit eingelagerten Knorpelzellen, sowie nekrotische Anteile über das gesamte Tumorgewebe verteilt. Zudem lässt sich eine Proliferation der Synovialmembran beobachten.

Die histologische Befundung der mit 10 mM aKA behandelten Gruppe (Abbildung 34, D) zeigt im Vergleich zur 1 mM aKA-Gruppe großflächigere nekrotische Anteile, die zusätzlich eingewanderte neutrophile Granulozyten aufweisen. Diese finden sich ebenfalls in der umgebenden Muskulatur und zeigt somit ein begleitendes entzündliches Geschehen. Zudem weist diese Gruppe periostale Reaktionen und zugebildete Spindelzellen unterhalb der Patellarsehne auf.



Vehikel, Tag 50

nur TZ, Tag 50

1mM, Tag 50

10mM, Tag 50

Abbildung 34: Vergrößerungen der Osteosarkome (H.-E.-Färbung) bei un behandelter (nur Tumorzellen-) (A), Vehikel- (B), mit 1 mM aKA-behandelter Gruppe (C) und mit 10 mM aKA-behandelter Gruppe (D) zum Zeitpunkt Tag 50. H= mit Knochenmark gefüllter Hohlraum, K=Kalk, + = neutrophile Granulozyten, †= Nekrose, in Osteoid eingebettete Chondrozyten sind mit einem Pfeil markiert. aKA= aromatisches Kohlenwasserstoff-Amphiphil, mM= millimolar, TZ= Tumorzellen.

2.4.2. Lungenhistologie

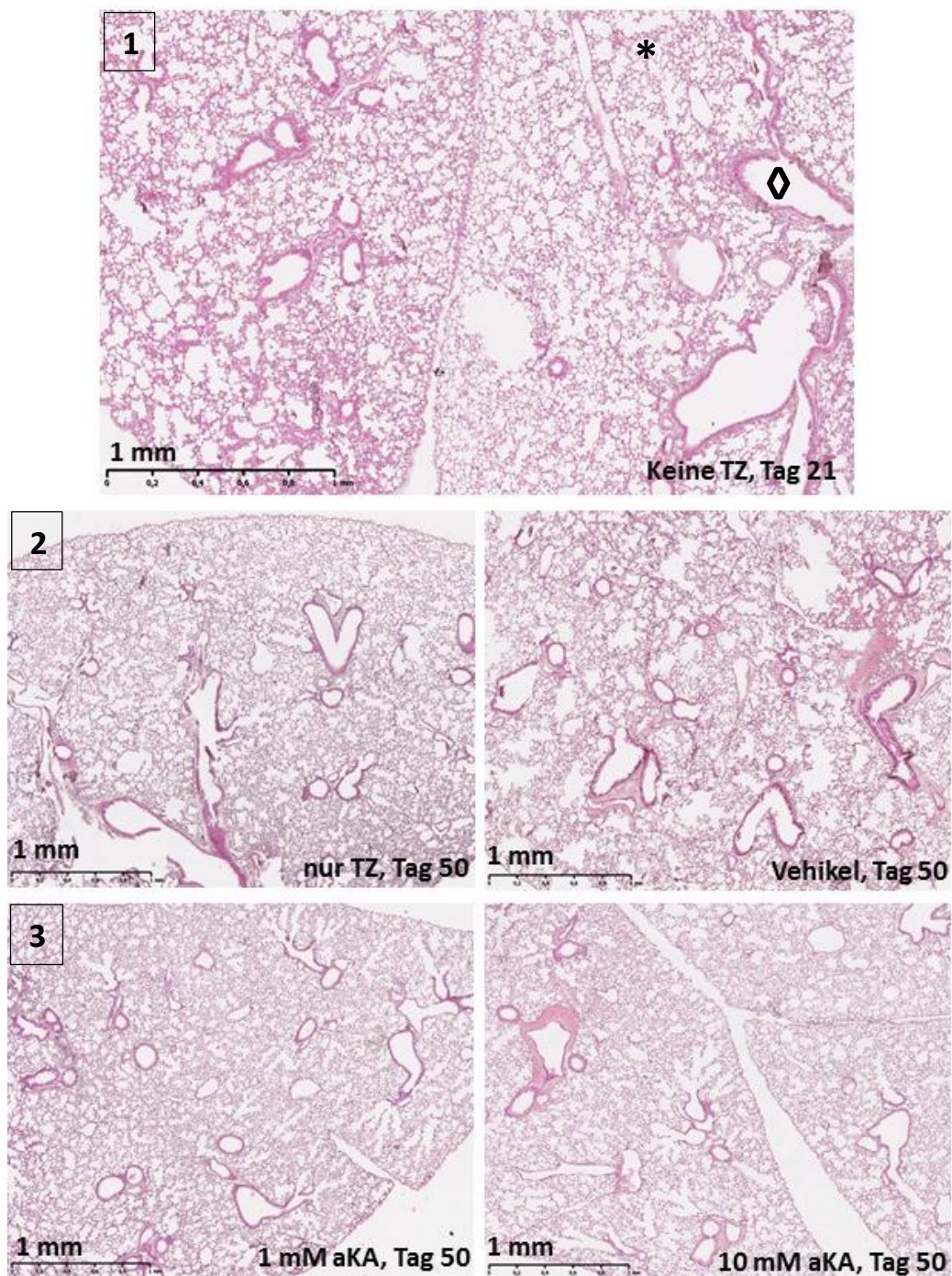


Abbildung 35: Übersicht repräsentativer histologischer Schnitte der Lunge in H.E.-Färbung. Das obere Bild zeigt die Lunge einer Maus, der keine Tumorzellen implantiert wurden. Alveolen (*), Bronchiolus (◊). In Reihe 2 und 3 sind Lungen der restlichen vier Gruppen zum Zeitpunkt Tag 50 zu sehen. aKA= aromatisches Kohlenwasserstoff-Amphiphil, mM= Millimolar, TZ= Tumorzellen.

In Abbildung 35 sind repräsentative histologische Schnitte der Lunge als Übersicht zusammengefasst. Es zeigte sich bei allen Mäusen ein physiologisches Lungengewebe ohne Hinweis auf Toxizität oder Metastasen des Osteosarkoms.

Leber- und Nierenhistologie

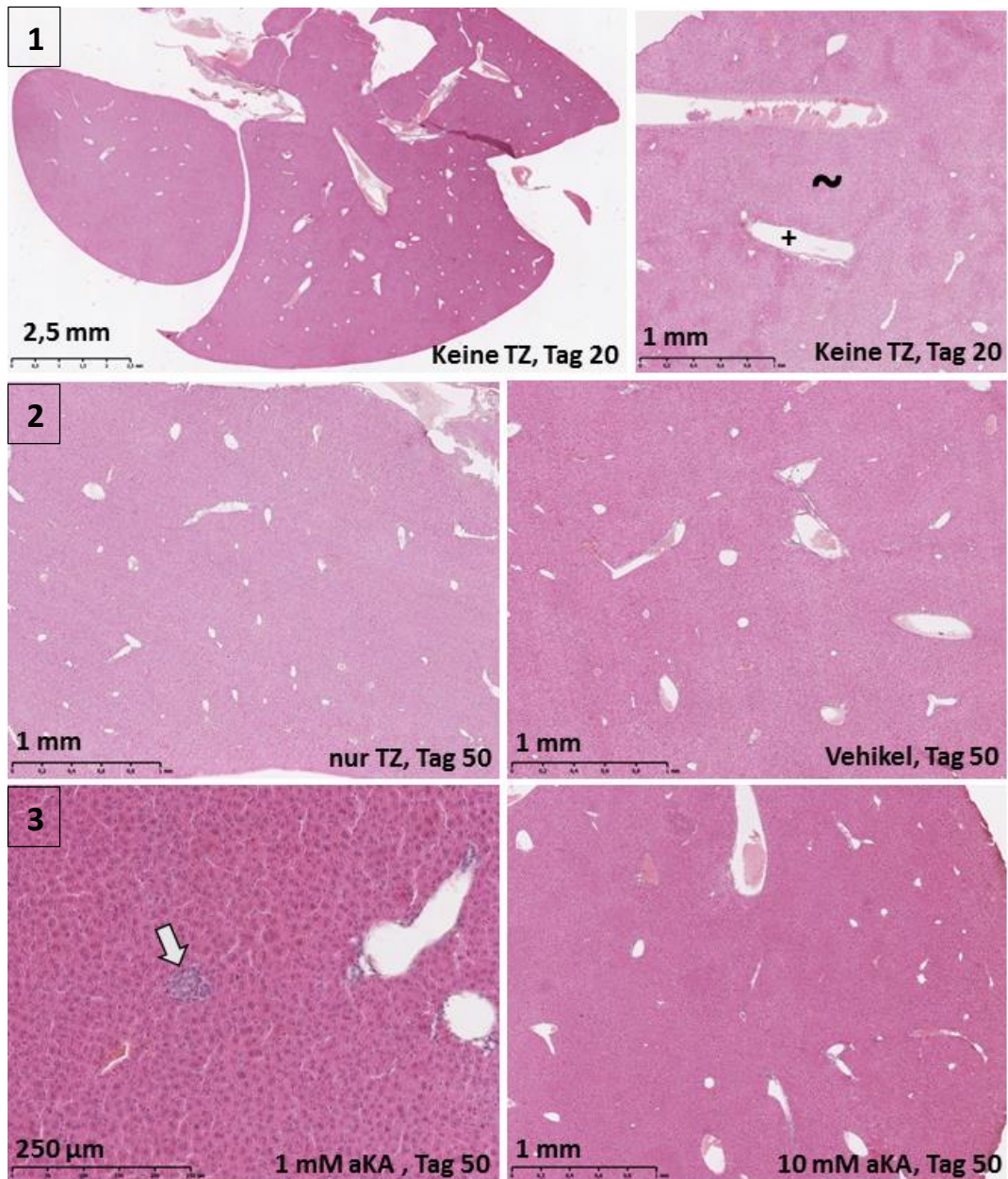


Abbildung 36: Übersicht repräsentativer histologischer Schnitte der Leber in H.E.-Färbung. Die obere Reihe zeigt die Leber einer Maus, der keine Tumorzellen implantiert wurden. Das linke Bild zeigt die Übersicht und das rechte eine Nahaufnahme mit Leberparenchym (~) und Blutgefäß (+), sowie fokaler mononuklearer Infiltration (Pfeil). In Reihe 2 und 3 sind Lebern der restlichen vier Gruppen zum Zeitpunkt Tag 50 zu sehen. aKA=aromatisches Kohlenwasserstoff-Amphiphil, mM= Millimolar, TZ= Tumorzellen.

Bei Sichtung der histologischen Leberschnitte aller Versuchsgruppen konnten neben der sporadischen minimalen mononukleären Infiltration keinerlei Auffälligkeiten beobachtet werden. In den Substanzgruppen konnten ebenfalls keine Hinweise auf eine toxische Wirkung des aKA festgestellt werden. Abbildung 36 zeigt eine Übersicht der Leberschnitte in H.E.-Färbung.

Das Gleiche trifft auf die Nierenschnitte zu. Es finden sich lediglich eine fokale bis multifokale mononukleäre Infiltration von geringgradiger Ausprägung. Abbildung 37 veranschaulicht den Zustand ohne Tumorzellimplantation und aKA-Applikation. Eine Übersicht über die restlichen vier Versuchsgruppen an Tag 50 gibt Abbildung 38.

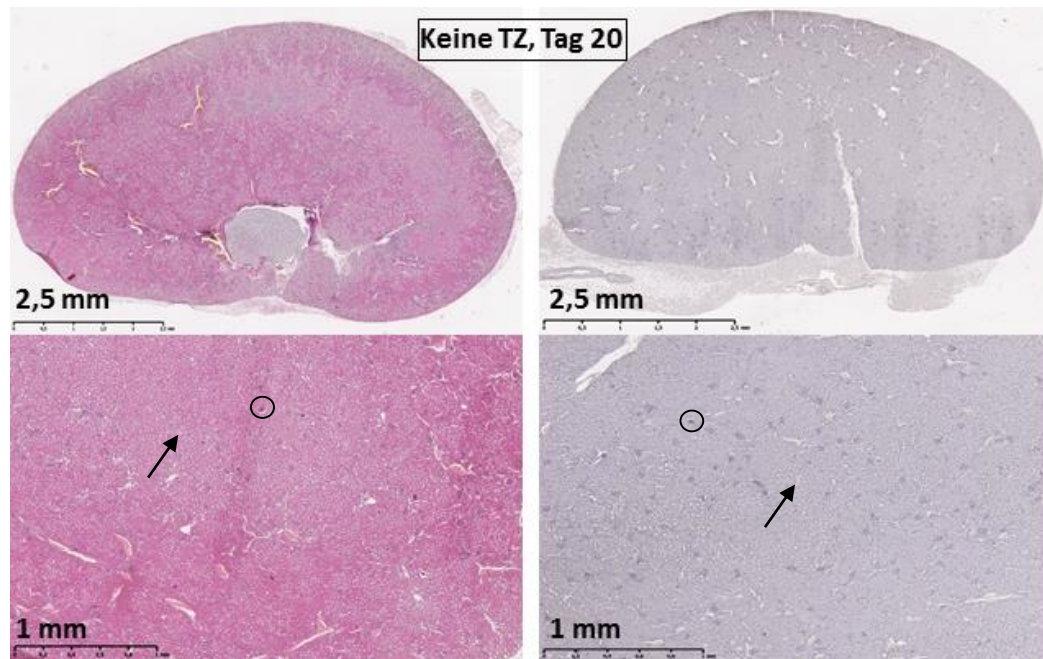


Abbildung 37: Übersicht repräsentativer histologischer Schnitte der Niere von Mäusen, denen keine Tumorzellen implantiert wurden in H.E.- (links) und PAS-Färbung (rechts) an Tag 20. Die obere Reihe zeigt Übersichtsbilder und die untere Reihe Nahaufnahmen mit Glomerulum (Kreis) und Tubuli (Pfeil). mM= millimolar, TZ= Tumorzellen.

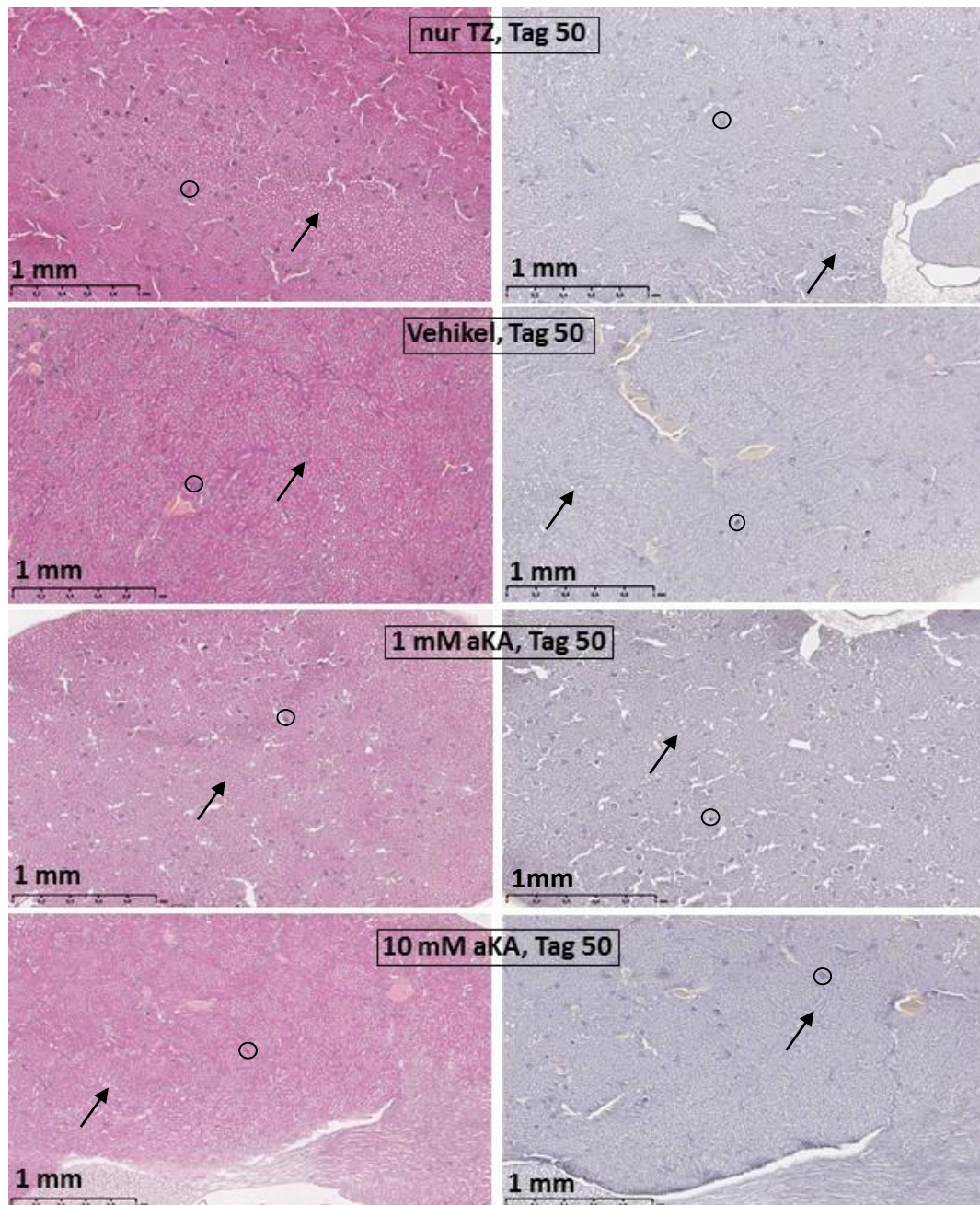


Abbildung 38: Übersicht repräsentativer histologischer Schnitte der Niere in H.E.- (links) und PAS-Färbung (rechts) der nur Tumorzellen-, Vehikel-, 1 mM- und 10 mM-Gruppe zum Zeitpunkt Tag 50 zu sehen. Kreis= Glomerulum und Pfeil= Tubuli. aKA= aromatisches Kohlenwasserstoff-Amphiphil, mM= Millimolar, TZ= Tumorzellen.

2.4.3. Fazit

Die Knochenhistologie zeigte die für Osteosarkome typische Osteoidbildung, Spindelzellformationen sowie auffallend viele in Osteoid eingebettete Knorpelzellen. Zudem ließ sich das infiltrative und expansive Wachstum der Osteosarkome nachweisen. Zwischen den Gruppen, denen Tumorzellen implantiert wurden, fanden sich qualitative Unterschiede. Diese bestanden hauptsächlich in den nekrotischen und verkalkten Arealen, die mit steigender Dosis bei den mit aKA-behandelten Gruppen vermehrt auftraten.

Alle vorgelegten Lungenschnitte waren ohne besondere Befunde und frei von Tumor und Metastasen. Auch bei Begutachtung der Leber- und Nierenproben fanden sich keine Hinweise auf aKA -relevante Toxizität. Ebenfalls wurden weder Tumor noch Metastasen in den vorgelegten Proben festgestellt.

Hinsichtlich der dritten Frage, ob sich bei der Applikation des aKA mit und ohne Tumorzellimplantation Nebeneffekte toxischer und nicht-toxischer Art ergeben, kann gesagt werden, dass die subkutane Applikation des aKA keine nennenswerten pathologischen Veränderungen in der histologischen Untersuchung von Knochen, Leber, Lunge und Niere zeigte. Zudem lieferte die Evaluation der Analyten IL-6, TNF α und VEGF in den Plasmablutproben keinen Hinweis auf ein systemisches inflammatorisches Geschehen. Tumorzelltragende Gruppen, die mit aKA behandelt wurden, wiesen insbesondere in der hohen Dosierung (10 mM) nekrotische und verkalkte Knochengewebsanteile auf.

V. DISKUSSION

Trotz neoadjuvanter Chemotherapie in Kombination mit einer im Idealfall Tumorresektion in toto stagnieren die Überlebenszeiten der zumeist noch jungen Osteosarkompatienten seit Jahren (Gebert et al., 2002; Zhi et al., 2018). Ein ähnliches Bild ergibt sich bei der Spezies Hund, hier schließt die therapeutische Intervention zumeist noch die Amputation der betroffenen Gliedmaße ein. Zusätzlich geht das kanine Osteosarkom mit einer höheren Aggressivität einher (Gorman et al., 2006; Morello et al., 2011). Daher herrscht ein dringlicher Bedarf an innovativen diagnostischen und therapeutischen Ansatzpunkten zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien.

Einen solchen Ansatzpunkt stellt die zielgerichtete Bekämpfung der malignen Osteosarkomzellen unter gleichzeitiger Schonung des gesunden umgebenden Gewebes dar. Unverzichtbar bei der Entwicklung eines innovativen Therapieverfahrens ist ein passendes präklinisches Tiermodell, um erste *in vivo*-Daten erheben zu können. Anhand dieser Daten kann dann eine Aussage über die Wirksamkeit des Therapieverfahrens und die Eignung des präklinischen Tiermodells getroffen werden.

Darauf aufbauend bestand das Ziel dieser Studie in der Erhebung primärer Daten bezüglich des Einflusses des aKA auf Tumorzellmetabolismus, Tumorprogression, Metastasierung und mögliche Nebeneffekte im murinen Modell. Initial wurde unter standardisierten Zellkulturbedingungen die Auswirkung des aKA auf die metabolische Aktivität der K7M2-Osteosarkomzellen untersucht. Dies diente der Entwicklung einer passenden Kombination von Tumorzellen und therapeutischem Agens für die nachfolgenden *in vivo*-Versuche. Dabei erfolgte dann die Implantation der K7M2-Zellen in die proximale Tibia von C57BL/6J-Mäusen. Der Einfluss unterschiedlicher Dosen des aKA wurde nach 20, 21, 35 und 50 Tagen mittels μ CT, Multiplex-ELISA der Plasmaproben und Histologie evaluiert. Zusätzlich konnten intraosseäre Sauerstoffdaten erhoben werden.

Auf lange Sicht besteht das Ziel dieser Forschung in der Verbesserung der Diagnose, Therapieeffektivität, Überlebenszeiten, Lebensqualität und Schonung

des gesunden Gewebes bei Mensch und Hund. Dies ist aus heutiger Sicht, wie bereits erwähnt, leider noch nicht gelungen. Eine der ganz großen Schwierigkeiten besteht in der Heterogenität der Klinik und des Verlaufs von neoplastischen Erkrankungen selbst innerhalb einer Spezies, ganz besonders des Osteosarkoms bei Hund und Mensch. Es gilt also Strategien aufzuzeigen, die all diese Anforderungen erfüllen und die nächste Stufe der tumorzellspezifischen Therapie ermöglichen.

1. Beurteilung des präklinischen Tiermodells

Für diese Studie wurde die Maus als Versuchstier gewählt, da sie ein absolut etabliertes Tiermodell in der Osteosarkomforschung darstellt und somit die Ergebnisvergleichbarkeit gegeben ist. Laut Guijarro und Ghivizzani et al. gehört zu den meistverwendeten Tiermodellen neben der Maus auch die Ratte (Guijarro et al., 2014). Das prinzipiell ebenfalls in Frage kommende Kaninchen war damit für unseren Versuch ungeeignet, da erst ein neues Modell etabliert werden müsste, die Ergebnisse somit nicht mit entsprechenden vorangegangenen Publikationen vergleichbar wären und dies nicht im Sinne der 3R wäre. In Bezug auf Ratten bestand das Problem darin, dass aktuelle Osteosarkommodelle auf strahlungsinduzierten Tumoren basieren (Botter et al., 2014). Bei Mäusen hingegen gründen die Modelle auf spontan auftretenden Osteosarkomen, was dem Großteil der Krankheitsbilder bei Mensch und Hund entspricht und somit in Hinblick auf eventuellen klinischen Studien die bessere Ausgangslage bot. Zudem sind die genetischen Eigenschaften der aus dem spontan aufgetretenen Tumor isolierten Osteosarkomzelllinie K7M2 denen der humanen Neoplasie sehr ähnlich (z.b. durch die Expression von Integrin 4, Ezrin, Clusterin, Decorin und Ceruloplasmin). In Kombination mit der verwandten Osteosarkom-Zelllinie K12 könnte zur weiteren Verbesserung im Rahmen zukünftiger Versuche sogar die heterogene Aggressivität des humanen Osteosarkoms abbildet werden (Ek et al., 2006). Trotzdem all dieser Vorteile ist die klinische Übertragbarkeit begrenzt, diese muss dann in einem nächsten Schritt mittels eines Kleintiermodells, wie beispielsweise dem Hund, verbessert werden. Dies ist insbesondere aufgrund der vielen genetischen Parallelen zwischen kaninen und humanen Osteosarkomen äußerst attraktiv (Paoloni et al., 2009). Das kanine Modell schied im Rahmen einer

ersten *in vivo*-Anwendung aus ethischen und finanziellen Gründen aus.

Die verwendete C57BL/6J-Maus ist der weltweit meist verwendete Inzuchtstamm und war der erste Stamm, dessen Genom sequenziert wurde. Dieser immunkompetente Mausstamm gilt allgemein als variabel einsetzbar und wird gerne u.a. für Sicherheits- und Effizienzversuche herangezogen. C57BL/6 Mäuse sind langlebig und wenig anfällig für spontan auftretende Tumoren, was im Zusammenhang der onkologischen Forschung von Bedeutung ist. In der Zucht sind die Mäuse gesund und fertil und zeigen keinen pathologischen Phänotyp (Laboratory, 2017). Im Rahmen dieser Studie fiel die Wahl aufgrund der benötigten Immunkompetenz, Robustheit, des etablierten Modells und Kostengünstigkeit auf diesen Mausstamm. Für den Versuch wurden männliche Mäuse verwendet, da diese keinen zyklischen Schwankungen unterliegen und schneller an Gewicht zunehmen. Die männliche Rivalität kann zu Rankämpfen in der Käfighaltung führen, diese Probleme traten im Rahmen dieser Arbeit aber nur in nicht nennenswertem Ausmaß auf.

Um dem natürlichen Entstehungsort möglichst realistisch zu imitieren, entschieden wir uns für die etablierte orthotope Tumorzellimplantation in die proximale Tibia (Khanna et al., 2000; Khanna et al., 2001; Park et al., 2010; Mu et al., 2016). Diese Voraussetzung erfüllen die anderen Möglichkeiten der subkutanen und intravenösen Injektion nicht. Es liegt nahe, dass sich Tumorzellen völlig anders verhalten, wenn sie sich nicht in ihrer eigentlichen Zellumgebung befinden. Zudem ist bekannt, dass bei der etablierten Schwanzveneninjektion eine erhöhte Gefahr der Schwanznekrose nach paravenöser Injektion besteht (siehe Empfehlung zur Substanzapplikation bei Versuchstieren - GV Solas). Dies hätte große Probleme hinsichtlich der Untersuchung auf Nebeneffekte des aKA bereitet und sogar zum Ausscheiden der Maus aus dem Versuch führen können. Mit entsprechender Übung war die intratibiale Injektionsmethode gut durchführbar, entscheidend ist dabei die maximale Beugung des Kniegelenkes und das Ertasten der Tibiatuberositas vor Penetration des Knochens. Hilfreich war ein vorheriges Befeuchten der Implantationsstelle mit Ethanol zur besseren Sicht. Zusätzliche Hilfestellung gab die Positionskontrolle mittels μ CT-Scoutscan. Diese Verifikation des Kanülensitzes ist jedoch mit einem Ablegen der Kanüle und angesteckter

Spritze verbunden, womit eine Positionsänderung oder gar die Explantation der Kanüle provoziert werden kann.

Die Wahl der Zeitpunkte basiert auf Erfahrungswerten anderer Forscher (Sabile et al., 2012). Drei Wochen nach Tumorzellimplantation kann die Neoplasie zumeist makroskopisch visualisiert werden (Sabile et al., 2012). Er wurde zudem gewählt, da das Tumorwachstum zu diesem Zeitpunkt in der Literatur bei einem Großteil der Tiere nachweisbar war (Broadhead et al., 2011; Broadhead et al., 2012; Broadhead et al., 2015). Daher wurde der Behandlungsbeginn nach 20 Tagen angesetzt. Einen Tag später (Tag 21) diente der kurzfristigen Evaluation der zu untersuchenden Fragestellungen, während an Tag 35 langfristige Unterschiede untersucht wurden. Die 14-tägige Behandlungsphase orientierte sich an den Versuchen von Mu et al. (Mu et al., 2016). Aus dieser Arbeit stammt ebenfalls die Angabe, dass ab 6-7 Wochen (42-49 Tage) der Tumor im Durchschnitt eine Größe von ca. 1 cm aufweist (Mu, Agarwal et al. 2016). Da das Abbruchkriterium laut GV-Solas „Kriterien zur vorzeitigen Tötung von tumortragenden Mäusen und Ratten“ bei 1,5 cm liegt, wurde eine Versuchslänge von 50 Tagen gewählt, um die Beendigung des Versuches ohne Erreichen der Abbruchkriterien gewährleisten zu können. In diesen zeitlichen Rahmen passte auch die Metastasierung nach 5 Wochen (Shi et al., 2016).

Bei Implantation der Tumorzellen wurden in Anlehnung an die Literatur insgesamt 20 µl (80% Matrigel mit 1×10^6 Zellen/ml) injiziert (Dass et al., 2006). Es wurde dabei initial eine 30 G Nadel verwendet, diese erwies sich jedoch im Rahmen der Methodenetablierung als zu groß, es hätte eine erhöhte Gefahr der Frakturierung des Knochens bestanden. Somit wurde im weiteren Versuchsverlauf eine Nadel der Größe 27 G verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten weder röntgenologisch noch histologisch Metastasen beobachtet werden. Zudem traf die Aussage nicht zu, dass bei einem Großteil der Mäuse an Tag 20 Tumoren makroskopisch detektiert werden konnten. Auch bei den Tieren mit bereits nachgewiesener Neoplasie wies die Tumorgöße eine sehr heterogene Verteilung auf. Eine Tumorgöße von 1 cm wurde zudem im gesamten Versuchszeitraum bei keiner Maus erreicht. Diese Unterschiede im Verlauf sind vermutlich auf die Injektionsmethode in

Kombination mit Matrigel und einer dadurch möglichen inhomogenen Mischung bzw. ungleichmäßigen Verteilung der Tumorzellen auf die einzelnen Spritzen zurückzuführen. Hier muss definitiv ein optimierter Mischvorgang der Zellen und Matrigel ohne zu viel Blasenbildung etabliert werden oder aber über eine Implantation ohne Matrigel nachgedacht werden. Ein weiteres Problem mit dem Matrigel stellen die bereits erwähnten Luftembolien dar. Diese traten unmittelbar nach intratibialer Injektion der Tumorzell-Matrigel-Mischung auf. Auslöser dafür war zum Einen das Totvolumen der implantierten Kanüle sowie kleine Bläschen, die beim Resuspendieren von 80% Matrigel und Tumorzellen trotz größter Sorgfalt generiert wurden. Nach Optimierung des Prozesses, bei dem die Kanüle vor Implantation mit sterilem PBS gespült wurde, konnten die weiteren Injektionen problemlos durchgeführt werden.

Broadhead et al. konnten erfolgreiche intratibiale Tumorzellimplantationen (andere Zelltypen OPGR80 oder SaOS2) mit Matrigel durchführen, beschrieben jedoch ebenfalls ein inhomogenes Tumorwachstum; bei 6 Mäusen wuchs gar kein Tumor (Broadhead et al., 2011; Broadhead et al., 2012; Broadhead et al., 2015). Khanna et al., die die Zelllinie etablierten, verwendeten bei der Implantation kein Matrigel sowie höhere Zellzahlen und berichten von außergewöhnlicher Aggressivität und zügigem Tumorwachstum (Khanna et al., 2000; Khanna et al., 2001; Khanna et al., 2004). Somit scheint das Matrigel durchaus einen Einfluss auf das Tumorwachstum zu haben und das Verwenden desselben sollte je nach Versuchszweck und -ziel gut überlegt sein. In Kombination mit Matrigel ist demnach zusätzlich eine höhere Zellzahl zu empfehlen.

Die tägliche therapeutische intratumorale Injektion fand über einen Zeitraum von 14 Tagen statt. Dieser Zeitraum orientiert sich an den bereits publizierten und etablierten Studien (Mu, Agarwal et al. 2016). Ebenso ist die lokale Applikation des therapeutischen Agens gängige Praxis in der Forschung (Kuang et al., 2014b; Ma et al., 2015). Da die *in vitro*-Versuche von Pires et al. (Pires, Abul-Haija et al. 2015) gezeigt haben, dass bereits ≤ 7 Stunden nach Inkubation mit dem aKA die metabolische Aktivität der Osteosarkomzellen reduziert wird und nach 24 Stunden der Zelltod eintritt, fiel die Wahl auf die tägliche Injektion. Es sollte ein konstant hoher Wirkspiegel im Tumor vorherrschen. Nachteile dieser täglichen lokalen

Injektion waren zum Einen die notwendige tägliche Isoflurannarkose, die die Mäuse jedoch die meiste Zeit gut vertrugen. Nur gegen Ende der zwei Wochen trat bei wenigen Tieren eine geringgradige Dyspnoe auf, die sich sofort nach Entfernen der Gasmasken wieder legte. Zum Anderen besteht durch die Kanülenpenetration die Möglichkeit der Provokation von Knochenreaktionen. Dem widersprechen jedoch die Knochenvolumenergebnisse des letzten Zeitpunktes, da die nur Tumorzellen-Gruppe hier im Vergleich zu den behandelten 1 mM- und 10 mM-aKA-Gruppen ein höheres Knochenvolumen aufwies.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass dieses orthotope Mausmodell ein etabliertes und gut funktionierendes, präklinisches Modell für die Osteosarkomforschung darstellt. Die Diskrepanzen zur gesichteten Literatur sind wie bereits erläutert höchstwahrscheinlich auf die Injektionsart mit Matrigel zurückzuführen und bedürfen einer Optimierung durch Zellzahlerhöhung und Blasenvermeidung.

2. Osteosarkom-Zelllinie K7M2

Zur Induktion des Osteosarkoms wurde im Rahmen dieser Arbeit die Zelllinie K7M2 verwendet. Diese ging ursprünglich aus einem spontan aufgetretenem murinen Osteosarkom hervor und wurde von Khanna et al. etabliert (Schmidt et al., 1988; Khanna et al., 2000; Khanna et al., 2001). Die Wahl fiel auf diese Zelllinie, da sie bereits vielfach publiziert wurde und somit ein etabliertes Tumormodell in der Maus darstellt. Es handelt sich um ein syngenetisches Modell, das heißt Tumorzellen und Empfänger gehören derselben Spezies an. Zudem ist die K7M2-Zelllinie sehr gut für die orthotope Implantation geeignet und kann in immunkompetenten Mäusen verwendet werden. Die Immunkompetenz war Voraussetzung für das Untersuchen potentieller systemischer Nebeneffekte und die histologische Evaluation. In der Literatur wird zudem eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit (95%) des Tumorwachstums nach exakter Implantation angegeben (Khanna et al., 2000; Dass et al., 2006; Botter et al., 2014; Shi et al., 2016; Zhao et al., 2016). Zudem zeichnen sich die K7M2-Zellen durch ein homogenes Primärtumorwachstum aus, was für die Vergleichbarkeit von enormer Bedeutung ist (Khanna et al., 2000). Dieses einheitliche Wachstumsverhalten wird

allerdings dem heterogenen biologischen Verhalten von humanen und kaninen Osteosarkomen nicht gerecht. Die grundsätzliche Problematik vom Wunsch nach Standardisierbarkeit bei Tierstudien und gleichzeitig nach einer möglichst realitätsnahen Imitation der zu erforschenden Krankheit ist auch in dieser Studie gegenwärtig (Histing et al., 2011).

Viele andere Modelle bedienen sich primär humaner Zelllinien, wie beispielsweise der viel verwendeten SaOS2-Zelllinie. Diese kam auch in den *in vitro*-Versuchen von Pires et al. zum Einsatz (Pires et al., 2015). In dieser Studie wurde sich dagegen entschieden, da das Primärtumorwachstum sehr viel länger dauert (1-2 Monate, im Vergleich zu 2-4 Wochen bei der K7M2-Zelllinie) (Botter et al., 2014). Mit dem Ziel der tatsächlichen Epidemiologie möglichst nahe zu kommen und den Versuchsaufbau möglichst kurz zu halten, fiel die Entscheidung für die orthotope Implantation in die Tibia und die K7M2-Zelllinie.

2.1. *In vitro*

In der Kultur zeigten die Zellen sich adhärent und mit spindelförmiger Morphologie. Die Zellen proliferierten unter Standardzellkulturbedingungen sehr schnell, dabei wirkte sich die Kultivierung unter subkonfluenten Konditionen zusätzlich positiv auf die Proliferation aus. Die benötigte Zellmenge konnte somit innerhalb kurzer Zeit erreicht werden. Es wurden nur Zellen der Passage 2 verwendet, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Die in dieser Arbeit erhobenen *in vitro*-Ergebnisse bestätigen die Daten von Pires et. al (Pires et al., 2015) trotz der veränderten Zelllinie. Nach 7 Stunden war dieselbe dosisabhängige Verteilung zu beobachten. Die 1 mM-Gruppe wies sogar signifikant niedrigere Zellviabilitäten im Vergleich mit der Kontrollgruppe auf. 24 Stunden nach aKA-Exposition war die Viabilität der mit aKA-behandelten Zellen bis nahe dem Nullpunkt weiter gesunken. Dies konnte durch die zusätzlich erhobenen DNA-Quantifizierungs- und Sauerstoffdaten bestätigt werden.

2.2. *In vivo*

Auch für den *in vivo*-Versuch war die schnelle Proliferation und unkomplizierte Kultur von Nutzen. Zwischen den unterschiedlichen Passagen konnte morphologisch und proliferativ kein Unterschied festgestellt werden, dennoch

wurden nur Zellen mit maximal 2 Passagen (P2-P4) Unterschied verwendet, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Wie bereits in Kapitel V.1 erwähnt, kam es im Rahmen dieser Studie zu einem heterogenen Tumorwachstum beim Vergleich zwischen den Mäusen innerhalb und außerhalb einer Versuchsgruppe.

3. Eignung des aromatischen Kohlenwasserstoffamphiphils (aKA) und Vergleich mit ähnlichen Therapieansätzen

Die Präparation der aKA-Lösung in gewünschter Konzentration gestaltete sich unkompliziert und kurzweilig. Beim Abwiegen ist eine sehr sensitive Waage zu empfehlen, da für die verwendeten Konzentrationen nur sehr geringe Mengen benötigt werden. Das Auflösen des weißen Pulvers in PBS gelang mit Hilfe des Vortex problemlos, jedoch musste die Lösung danach etwas stehen gelassen werden, um dem entstandenen Schaum Zeit zum Abbauen zu geben. Bedingt durch den Volumenverlust während der Filtration sollte immer mindestens 30% Puffer mit eingerechnet werden. Zur Haltbarkeit gibt es bisher keine Daten. In dieser Arbeit wurde die zubereitete aKA-Lösung maximal eine Woche bei +4 °C gelagert und verwendet.

Die *in vitro*-Versuche von Pires et al. zeigten eine selektive Wirkung des aKA auf Osteosarkomzellen, die eine sehr hohe Expression der ALP aufweisen (Pires et al., 2015). Im Rahmen der Versuche wurden zudem als Kontrolle Prächondrozyten (mit niedriger ALP-Expression) in Zusammenhang mit dem therapeutischen Agens getestet. Das aKA beeinträchtigte die metabolische Aktivität der Prächondrozyten nur in minimalen Ausmaß (Pires et al., 2015). In der Literatur finden sich unterstützende Angaben über eine wesentlich höhere ALP-Aktivität in Osteosarkomzellen im Vergleich zu Osteoblasten (Jonsson et al., 1999; Voegele et al., 1999; Pautke et al., 2004). Somit gingen wir von höchstens minimalen Auswirkungen des therapeutischen Agens auf die gesunden Knochenzellen aus. Trotzdem wären für zukünftige Experimente die Untersuchung des Einflusses von aKA auf Osteoblasten sehr interessant.

Bei der therapeutischen Injektion wurden insgesamt 50 µl (aKA in PBS)

intratumoral injiziert. Das Volumen wurde aufgrund ähnlicher vorheriger Anwendungen gewählt (Brekken et al., 1999). Die Applikation des aKA erfolgte bei der 1 mM- und 10 mM-Gruppe ausschließlich lokal am Tumor und nicht systemisch. Aufgrund dessen und der Vorversuche von Pires et al. gingen wir davon aus, dass andere Zellpopulationen durch das therapeutische Agens nicht geschädigt werden und keine systemischen Nebeneffekte zu erwarten sind (Pires et al., 2015). Auch nach der 14-tägigen aKA-Injektion konnte in der Peripherie der Injektionsstelle keine Hautveränderungen oder Ähnliches beobachtet werden. Systemisch ließen sich weder hämatologisch noch histologisch systemische Nebeneffekte nachweisen. Vor Injektion des aKA sollte der feste Sitz der Kanüle überprüft werden, da das aKA mit einem etwas höheren Druck appliziert werden muss. Die Injektion sollte anschließend zusätzlich nicht zu schnell vorgenommen werden. Durch das Verwenden einer Insulinspritze ohne Totraum konnte das Applizieren des gesamten Volumens sichergestellt werden.

Die Dosiserhöhung (1 und 10 mM) im Vergleich zu den *in vitro*-Versuchen (0,5 und 1 mM) lässt sich durch die unterschiedlichen Bedingungen bei *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen begründen. Zellen zeichnen sich *in vitro* durch eine wesentlich höhere Empfindlichkeit aus und dürfen dementsprechend keinen zu hohen Dosen ausgesetzt werden. Unter *in vivo*-Bedingungen hingegen befinden sich die Zellen im Gewebsverband, sind somit wesentlich weniger empfindlich und weisen viel höhere Metabolisierungsraten auf. Um die Wirksamkeit dennoch gewährleisten zu können, ist beim Wechsel von *in vitro*- auf *in vivo*-Konditionen eine Dosiserhöhung von Nöten (Checkley et al., 2015; Wang et al., 2016a). Aufgrund dessen sollte eine geringe Dosis des Agens (1 mM) sowie auch eine höhere Dosis des Agens in diesem Tierversuchsvorhaben untersucht werden (10 mM).

Das aKA reiht sich in eine Vielzahl ähnlicher brandaktueller Therapieansätze ein, die unter dem Oberbegriff „enzyme-instructed self-assembly“ (EISA) zusammengefasst werden (Huang und Gao, 2018). EISA ist ein Teil der supramolekularen Chemie (Whitesides und Grzybowski, 2002), die sich mit der intermolekularen Bindung sowie der Struktur und Funktion von Supramolekülen beschäftigt (Siegel, 1996). Per definitionem handelt es sich bei EISA um einen mehrschrittigen Prozess der Bildung spezieller funktioneller Strukturen, bei dem

amphiphile Moleküle bestimmte Transformationen durchlaufen. Dies wird ausgelöst durch Enzyme bevor es anschließend zur Assemblierung kommt (Zhou und Xu, 2015). Die Grundbausteine der EISA bestehen in einem zum Enzym passenden Substrat (Vorläufermolekül) und die Fähigkeit zur Selbstassemblierung nach enzymatischer Konvertierung. Die Selbstassemblierung der Nanofäden führt im weiteren Verlauf zur Gelbildung (Terech et al., 1996; Wang et al., 2000; Huang und Gao, 2018). Hauptziel dieses präzisionsmedizinischen Ansatzes ist die Steigerung der Therapieeffizienz unter Schonung des restlichen gesunden Gewebes (Ohta et al., 2016; Sindhvani et al., 2016). Selbstassemblierung und Enzymaktivität sind völlig normale Prozesse des physiologischen Metabolismus vieler Zellen. Beispielsweise stellen intrazelluläre Vesikel-Bildung, Zellskelettdynamik, Mitose und Zellbewegung enzym-induzierte Vorgänge dar (Pollard und Cooper, 2009; Fletcher und Mullins, 2010). Mit diesem Wissen im Hinterkopf legten Yang et al. den Grundstein für die Entwicklung der EISA zur Nutzung in der biomedizinischen Anwendung (Yang et al., 2004). Weiter modifiziert und für die *in vitro*-Anwendung optimiert wurde EISA von Zhao et al. (Zhao et al., 2010).

Einer der großen Vorteile dieser Strategie besteht in der Tatsache, dass die verwendeten Komponenten einfach chemisch herstellbar sind, biokompatibel sind und nur durch schwache nicht-kovale Kräfte zusammengehalten werden, sodass sie leichter durch den Körper abgebaut werden können. Diese schwachen Kräfte bedingen zusätzlich eine gleichmäßigere Anordnung der Nanofäden im Gel (Huang und Gao, 2018). Zudem stellt EISA einen isothermalen Prozess dar, der unter physiologischen Bedingungen ablaufen kann (Huang und Gao, 2018). Des Weiteren weisen die benötigten Vorläufermoleküle eine so geringe Größe auf, dass sie durch passive Diffusion oder aktiven Transport leicht das Tumorrinnere oder sogar Tumorzellen penetrieren können. Eine zusätzliche optimierende Modifizierung des Vorläufermoleküls ist ebenfalls möglich. Dies bedingt die bessere Effizienz im Vergleich zu anderen Therapiestrategien, da keine Abhängigkeit von Zelloberflächenrezeptoren oder vaskulären Undichtigkeiten besteht. Voraussetzung ist die Überexpression des katalysierenden Enzyms in dem zu bekämpfenden Zelltyp (Huang und Gao, 2018). Des Weiteren eröffnet diese

Methodik die Möglichkeit bisher als untherapierbar geltende Tumorzellen angreifbar zu machen (Zhou und Xu, 2015), auch durch Kombination mehrerer Angriffspunkte. Kehrseite der EISA stellt zum Einen die begrenzte Anzahl an Enzymen dar, die eine Selbstassemblierung katalysieren können (Huang und Gao, 2018). Zudem sind die inhibitorischen Konzentrationen der selbstassemblierenden Moleküle noch zu hoch für die pharmazeutischen Standards (Wang et al., 2016c). Zusätzlich ist bisher noch zu wenig über Interaktion zwischen potentiellen Zielproteinen und in situ-Aggregaten bekannt, außerdem fehlen Techniken zur Beobachtung dieser Interaktionen (Zhou et al., 2016b).

Die erste enzymatisch induzierte Bildung eines supramolekularen Hydrogels gelang Yang et al. mit dem Enzym Alkalischen Phosphatase (Yang et al., 2004). Weitere Modifikationen machten den Einsatz unter physiologischen Konditionen möglich sodass erste *in vitro*-Versuche gelingen konnten (Yang et al., 2008). Diese Methode könnte zusätzlich genutzt werden, um bereits angewendete Therapeutika in die Zielzelle zu transportieren ohne Bioaktivitätseinschränkungen zu erleiden (Gao et al., 2009). Eine erste *in vivo*-Anwendung führten Chen et al. mit HeLa-Zervixkarzinom-Zellen im Mausmodell durch. Sie waren in der Lage die Phosphatase-induzierten Nanofäden zur Bildgebung mit einem Farbstoff zu markieren und konnten damit die tumorspezifische Verteilung des Farbstoffes in der Maus nachweisen. Die Applikation des Vorläufermoleküls erfolgte intravenös (Huang et al., 2015). Anwendung könnte dies einmal in einer verlängerten intratumoralen Akkumulation eines therapeutischen Agens zur Therapieoptimierung finden (Huang und Gao, 2018). Kuang et al. behandelten immundefiziente Mäuse mit HeLa-Tumoren mittels peritumoraler Vorläufermolekül-Injektion. Eine 10 mg/kg-Dosis konnte das Tumorwachstum bereits inhibieren (33 Tage nach Tumorzellapplikation). Diese Inhibierung wurde nach drei 10 mg/kg-Dosen signifikant (39 Tage nach Tumorzellapplikation). Die Tumoren der unbehandelten Kontrollgruppe wiesen ein ca. 10-fach größeres Volumen auf als die mit 10 mg/kg behandelten Tiere. Zusätzlich waren Tumore der 10 mg/kg-Gruppe signifikant kleiner als jene der 1 mg/kg-Gruppe (Kuang et al., 2014a). Diese Ergebnisse gehen in eine ähnliche Richtung wie die in dieser Studie gewonnenen Daten. Auch wenn das aKA in unserer Studie im Vergleich keinen so

extrem ausgeprägten Effekt auf die Tumorgröße hatte, ist dennoch ein inhibierender Effekt und die gleiche Dosisabhängigkeit an Tag 50 zu erkennen.

Aktuell wird in der Literatur von weiteren Abwandlungen der Methodik berichtet, sodass beispielsweise gezielt Mitochondrien oder das Endoplasmatische Retikulum von Tumorzellen durch supramolekulare Assemblierung zerstört werden können (Wang et al., 2016b; Feng et al., 2018). Des Weiteren gelang es Du et al. spezifisch Tumorzellen mit ALP-induzierten D-Peptidnanofibrillen zu markieren, die autokrine proapoptotische Liganden präsentieren, sodass extrinsische Zelltodsignalwege aktiviert werden (Zhou et al., 2016a; Du et al., 2017). Andere Enzyme, die im Rahmen der EISA erforscht werden, sind beispielsweise die Carboxylesterase im Zusammenhang mit therapieresistenten Ovarialkarzinomzellen (Li et al., 2015; Feng et al., 2017), die Esterase zur verbesserten Zellaufnahme bioaktiver Moleküle (Zhou et al., 2015) und Matrixmetalloproteinasen zur Effizienzsteigerung von Doxorubicin (Kalafatovic et al., 2016).

Die Testung des aKA in unserem Mausmodell stellt somit eine der ersten erfolgreichen *in vivo*-Anwendungen der EISA-Methode dar. Das aKA verkörpert dabei das Vorläufermolekül, das durch die Katalyse der hoch exprimierten Alkalischen Phosphatase in die aktive, selbstassemblierte Form überführt wird. In der angewandten Form ist das aKA gut für den *in vitro*- und *in vivo*-Einsatz geeignet. Es bedarf allerdings weiterer Optimierung von Wirkung, Dosis, Zellspezifität und eventueller intrazellulärer Akkumulation sowie weiterer Forschung hinsichtlich Bildgebung, Interaktionen mit gesundem Gewebe, systemischer Nebenwirkungen, Biokompatibilität und Degradierung *in vitro* und *in vivo* (Cong et al., 2018; Huang und Gao, 2018). Dies könnte für EISA den Weg im Dienste der personalisierten Präzisionsmedizin ebnen.

4. Diskussion der *in vivo*-Ergebnisse

Der Allgemeinzustand und die Gewichtsentwicklung der Mäuse waren zu keiner Zeit unzufriedenstellend. Lediglich bei drei Mäusen der 10 mM-Gruppe konnte die geschilderte postaurikuläre Alopezie beobachtet werden. Dies könnte einerseits an der aKA-Applikation und/oder dem Tumorgeschehen liegen, jedoch auch

schlicht Alters- bzw. Stresserscheinungen darstellen (Laboratory, 2017). Um eine differenziertere Aussage treffen zu können, müsste eine größere Anzahl an Mäusen diesbezüglich untersucht werden. Der ansonsten gute Allgemeinzustand und Gewichtsstatus deutet jedoch nicht auf gravierende systemische Nebeneffekte hin.

Hinsichtlich der μ CT-Bildgebung ist zunächst festzuhalten, dass mit den gewählten Parameter sinnvolle Ergebnisse in der Analyse erzielt werden konnten. *In vivo* konnte aufgrund der Strahlenbelastung für die Maus (und Risikominimierung durch möglichst wenig Röntgenstrahlung) und aus zeitlichen Gründen nicht die höchste Auflösung von 9 μ m verwendet werden. In der verwendeten 35 μ m-Auflösung war bei der Knochenanalyse aufgrund der Unschärfe nicht einwandfrei möglich zwischen kortikalem und trabekulärem Knochen zu unterscheiden. Daher wurde in dieser Studie der gesamte Knochen evaluiert. Es hätte die Möglichkeit bestanden, die Knochenproben *ex vivo* in 9 μ m-Auflösung zu scannen, jedoch hätten sich die Knochen dann nicht mehr *in situ* befunden, was sich nachteilig auf Aussagekraft und die nachfolgende histologische Evaluation ausgewirkt hätte. Ein optimaler Kompromiss wäre ein *in situ*-Scan direkt nach der Euthanasie in 9 μ m Auflösung. Dabei ist jedoch immer noch die Dauer eines solchen hochauflösenden Scans im Hinterkopf zu behalten. Interessante Ergebnisse der μ CT-Analyse sind sicherlich die Knochenvolumen-Daten von Tag 35 und 50. Am Ende der 14-tägigen Behandlung sollte logischerweise der höchste Wirkspiegel an aKA lokal im Tumor vorherrschen. Es ist zu diesem Zeitpunkt ein dosisabhängiger Effekt zu sehen: Je höher die Dosis des aKA, desto größer ist das Knochenvolumen. Dies scheint zunächst paradox, jedoch liegt an Tag 50 der inverse dosisabhängige Effekt vor. Somit schienen an Tag 35 noch reaktive Prozesse im Gange gewesen zu sein und die Wirkung des aKA setzt erst später ein. Die Aussage, dass das aKA die Knochenmineraldichte positiv beeinflusst, kann dagegen sicher getroffen werden. Sowohl an Tag 35, als auch an Tag 50 weisen die mit aKA behandelten Gruppen eine signifikant höhere Knochenmineraldichte im Vergleich mit der Gruppe ohne Tumorzellen auf. Eine Erklärung hierfür könnte eine Verkalkung der toten Tumorzellen sein. Da die Knochen posthum jedoch für die histologische Untersuchung dekalzifiziert wurden, war es nicht möglich diese Verkalkungen im

vollen Umfang nachzuweisen. Trotzdem ist es gelungen bei den mit aKA-behandelten Gruppen vereinzelte verkalkte Areale histologisch darzustellen. Die vor allem bei der mit 10 mM aKA-behandelten Gruppe auffallenden nekrotischen Anteile lassen die Vermutung zu, dass dies womöglich eine zu hohe Dosis darstellt und eher niedriger gewählte Dosierungen für die weiterführende Erforschung verwendet werden sollten.

Im Rahmen dieser Studie konnten intraosseäre Sauerstoffmessdaten in der Tibia erhoben werden. Der Durchschnitt aller Messungen ergab einen Wert von 1,24 % O₂. Im Vergleich zwischen den Gruppen fiel kein Trend auf, jedoch ist auf die geringe Tierzahl pro Messgruppe hinzuweisen. Die bisherige Datenlage zu intraosseären Sauerstoffwerten ist sehr dünn. Die Literaturangaben liegen bei Ratte/Kaninchen zwischen 2,7-14,6 % O₂ (Brighton und Heppenstall, 1971) und bei der Maus bei 1,5-4,2 % O₂ (Spencer et al., 2014). Die in unserer Studie erhobenen Daten liegen im unteren Bereich der bisher erhobenen Sauerstoffdaten. Intratumorale Messungen waren aufgrund der histologischen Tumorevaluation nicht möglich.

Bei Begutachtung der erhobenen VEGF-Plasmawerte fallen sehr niedrige Zahlenwerte auf, wenn man diese mit ähnlichen Studien vergleicht (Keyes et al., 2004). Wie bei den anderen Analyten IL-6 und TNF- α , deren Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze lagen, bestand das Problem der geringen Probenvolumina und einer augenscheinlich zu hoch gewählten Verdünnung von 1:4 um ein entsprechendes Volumen für die Messung zu erreichen. Bei Betrachtung der Zeitpunkte Tag 35 und 50 ergibt sich trotzdem ein sinnvolles Bild, da die keine Tumorzellen-Gruppe die niedrigsten VEGF-Werte aufweist und von Tag 0 bis Tag 50 keine große Veränderung auftritt, solange man Tag 20 und 21 aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs außer Acht lässt. Wie in ähnlichen Studien steigen auch hier mit fortschreitendem Tumorwachstum die VEGF-Plasmalevel (Keyes et al., 2003; Keyes et al., 2004). Es fällt zudem die gleiche dosisabhängige Verteilung der Werte an Tag 35 wie bei der Knochenmineraldichte auf, was zusätzlich für eine gewisse Validität der Daten spricht. Somit sollte der Fokus auf die Relativität der Werte gelegt werden und nicht auf die absoluten Zahlen. Die dosisabhängige VEGF-Werte Verteilung an Tag 35 und die höheren

VEGF-Werte bei den aKA-Gruppen im Vergleich zur unbehandelten nur Tumorzellen-Gruppe könnten mit einer durch das aKA bedingten Hypoxie begründet werden. Wie bereits erwähnt, supprimiert das aKA die metabolische Aktivität der Osteosarkomzellen, was in einer Hypoxie resultieren könnte. Dass VEGF ein Zielgen des HIF-1 α darstellt und die Expression beider Moleküle unter hypoxischen Konditionen ansteigt (Steinbrech et al., 1999), würde diese Hypothese unterstützen. Eine erhöhte VEGF-Expression der Tumorzellen birgt durch die entscheidende Beteiligung von VEGF an der Angiogenese aber gleichzeitig das potentielle Risiko eines beschleunigten Tumorwachstums.

Histologisch zeigte sich das Bild eines durch K7M2-induzierten Osteosarkoms wie bereits in der Literatur beschrieben (Khanna et al., 2000; Hong et al., 2009), jedoch mit zusätzlich vielen in Osteoid eingebetteten Chondrozyten. Da sich bis Tag 50 histologisch auffallende Unterschiede zwischen unbehandelten und mit aKA behandelten Tumoren fanden (Nekrose und Verkalkung), sollte im Rahmen einer nächsten *in vivo*-Anwendung neben der verbesserten Tumorzellimplantation und dem dadurch bedingten progressiveren Wachstum eventuell längere Zeit nach Therapieende abgewartet werden, um die Langzeitwirkung des aKA insbesondere auf gesundes Knochengewebe untersuchen zu können.

5. Abschließende Beurteilung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte nach Bestätigung der Wirkung *in vitro* durch das aKA erfolgreich eine dosisabhängige Verringerung des totalen Knochenvolumens im Vergleich zur unbehandelten nur Tumorzellen-Gruppe zum Versuchsendpunkt erreicht werden. Die Wirkung trat dabei zeitverzögert zum Therapieende ein. Zudem bewirkte die Behandlung mit aKA eine dosisabhängige Erhöhung der Knochenmineraldichte. Histologisch konnten zwischen den mit aKA behandelten Gruppen qualitative Unterschiede hinsichtlich Nekrotisierung und Verkalkung ausgemacht werden, die mit steigender Dosis vermehrt auftraten. Es lagen weiterhin keine Hinweise auf systemische inflammatorische oder toxische Nebeneffekte vor, lediglich eine postaurikuläre Alopezie war bei drei Mäusen zu beobachten. Mit aKA behandelte Tiere wiesen höhere VEGF-Plasmalevel auf als unbehandelte Tiere. Intratibiale Sauerstoffmessungen des gesunden

kontralateralen Beines zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Damit stellt diese Studie eine erfolgreiche Anwendung eines EISA-Agens im Tiermodell dar. Die nächsten Schritte sollten die Optimierung der Tumorzellimplantation hinsichtlich Wachstumsgeschwindigkeit und –homogenität sowie weitere effizienzsteigernde Modifizierungen des Vorläufermoleküls aKA und eine Dosisoptimierung darstellen. Nach Etablierung des erweiterten murinen Modells sollte über die Übertragung ins kanine Großtiermodell nachgedacht werden, um eine bessere klinische Vergleichbarkeit zum Menschen zu ermöglichen. Zusätzlich würden derartige Studien auch der kaninen Osteosarkomtherapie neue Türen öffnen. Diese Strategie könnte Wegbereiter für eine tumorzellgerichtete und schonendere Therapie sein, mit dem Potential die Lebensqualität und Überlebenszeiten humaner und kaniner Patienten zu verbessern.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Einfluss eines neuartigen aromatischen Kohlenwasserstoff-Amphiphils (aKA) auf Tumorgenese und Metastasierung des Osteosarkoms im murinen Modell

Auf der tumorzellgerichteten Therapie neoplastischer Erkrankungen ruhen große Hoffnungen der Wissenschaft. Bevor diese jedoch Einzug in die Klinik halten kann, bedarf es aufwändiger Untersuchungen *in vitro* sowie *in vivo*. Pires et al. konnten bereits äußerst vielversprechende Ergebnisse während ihrer *in vitro*-Versuche bezüglich der Wirksamkeit des therapeutischen Agens aKA in Kombination mit einer Osteosarkomzelllinie erzielen. Darauf aufbauend sollte in dieser Arbeit eine erste *in vivo*-Anwendung des aKA im murinen Modell durchgeführt werden. Zunächst wurde in Vorbereitung dazu die verwendete Osteosarkomzelllinie K7M2 *in vitro* mit verschiedenen Dosen des aKA getestet. Anschließend sollte das aKA *in vivo* hinsichtlich seines Einflusses auf Tumorprogreß, Effizienz und systemische Nebeneffekte evaluiert werden. Zusätzlich sollten aufgrund der bisher geringen Datenlage intraossee Sauerstoffdaten generiert werden.

Zunächst wurde im Rahmen der *in vitro*-Versuche der Einfluss verschiedener Dosen des aKA auf die metabolische Aktivität der K7M2-Zellen mittels Viabilitäts-Assay, DNA-Quantifizierung, Mikroskopie und Sauerstoffmessungen untersucht. Im nächsten Schritt erfolgte dann die orthotope Implantation der K7M2-Zellen in die proximale Tibia männlicher C57BL/6J-Mäuse. Nach einer Tumorstadiumphase von 20 Tagen wurde dann über 14 Tage täglich mit verschiedenen Dosen des aKA behandelt. Von Tag 35 bis zum Versuchsende an Tag 50 erfolgte die Beobachtung der Tiere. Zu den Zeitpunkten Tag 0, 20, 21, 35 und 50 wurden Verlaufskontrollen mittels μ CT, Blutentnahme, Histologie der tumortragenden Tibia und Sauerstoffmessung der gesunden Tibia durchgeführt.

Analog zu den Versuchen von Pires et al. (Pires et al., 2015) konnte die metabolisch supprimierende Wirksamkeit des aKA auf K7M2-Osteosarkomzellen mit nachgewiesen werden. Der Unterschied war bereits nach 7 Stunden signifikant. Zusätzlich war es möglich eine dosisabhängige Oxygenierung 48 Stunden nach

aKA-Exposition nachzuweisen. Im präklinischen murinen Tiermodell konnte eine dosisabhängige Verringerung des totalen Knochenvolumens im Vergleich zur unbehandelten nur Tumorzellen-Gruppe am Tag 50 beobachtet werden. Die Wirkung trat dabei zeitverzögert zum Therapieende ein. Zudem bewirkte die Behandlung mit aKA eine dosisabhängige Erhöhung der Knochenmineraldichte. Histologisch konnten zwischen den mit aKA behandelten Gruppen qualitative Unterschiede hinsichtlich Nekrotisierung und Verkalkung ausgemacht werden, die mit steigender Dosis vermehrt auftraten. Es lagen keine Hinweise auf systemische inflammatorische oder toxische Nebeneffekte vor, lediglich eine reizlose postaurikuläre Alopezie war bei drei Mäusen zu beobachten. Mit aKA behandelte Tiere wiesen höhere VEGF-Plasmalevel auf als unbehandelte Tiere, was auf längere Sicht eine verbesserte Tumervaskularisierung und damit eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber hämatogen verabreichten Therapien, wie der Chemotherapie, bedeuten könnte. Intratibiale Sauerstoffmessungen des gesunden kontralateralen Beines zeigten physiologische Werte ohne signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Das aKA gehört damit zu den *in vitro* und *in vivo* erfolgreich angewendeten Mitgliedern der EISA (enzyme-induced self assembly)-Familie, in die in den letzten Jahren große Hoffnungen der Präzisionsnanomedizin gesetzt wird. Nach Optimierung und Etablierung des erweiterten murinen Modells könnte der nächste Schritt die Übertragung ins kanine Großtiermodell sein, um die klinische Vergleichbarkeit zum Menschen zu verbessern. Zusätzlich könnten derartige Studien der kaninen Osteosarkomtherapie neue Türen öffnen. Diese Strategie könnte Wegbereiter für eine langersehnte tumorzellgerichtete und schonendere Therapie sein, die Lebensqualität und Überlebenszeiten humaner und kaniner Patienten steigert.

VII. SUMMARY

Impact of a new aromatic carbohydrate amphiphile (ACA) on tumorigenesis and metastasis formation of osteosarcoma in a murine model

Great hopes of science rest on the tumor cell-directed therapy of neoplastic diseases. However, elaborate investigations *in vitro* and *in vivo* are required before it can be applied clinically. Pires' group has already achieved very promising results during their *in vitro* experiments on the efficacy of the therapeutic agent ACA in combination with an osteosarcoma cell line. Based on this, a first *in vivo* application of ACA in the murine model was carried out in this work. Initially, the used osteosarcoma cell line K7M2 was tested *in vitro* with various doses of ACA. Subsequently, ACA was aimed to be evaluated *in vivo* for its influence on tumor progression, efficiency and systemic side effects. In addition, we planned to generate data on intraosseous oxygen due to the insufficient data situation.

First, within the *in vitro* experiments, the influence of different doses of ACA on the metabolic activity of K7M2 cells was investigated using viability assay, DNA quantification, microscopy and oxygen measurements. The next step involved orthotopic implantation of K7M2 cells into the proximal tibia of male C57BL/6J mice. After a tumor growth phase of 20 days, the mice were daily treated with different doses of ACA for 14 days. From day 35 until the end of the experiment on day 50, the animals were under observation. At day 0, 20, 21, 35 and 50, follow-up monitoring was performed using μ CT, blood collection, histology of tumor-bearing tibia and oxygen measurement of healthy tibia.

Analogous to the experiments of Pires et al. (Pires et al., 2015), the metabolic suppressing effect of ACA could be demonstrated on K7M2 osteosarcoma cells. The difference was already significant after 7 hours. In addition, it was possible to detect dose-dependent oxygenation 48 hours after ACA exposure. In the preclinical murine model, a dose-dependent reduction in total bone volume compared to the untreated tumor-only group was observed on day 50. The effect

occurred with a time delay after the end of therapy. In addition, treatment with ACA caused a dose-dependent increase in bone mineral density. Histologically, qualitative differences in necrosis and calcification could be identified between groups treated with ACA, which increased with higher dose. There was no evidence of systemic inflammatory or toxic side effects, with only mild postauricular alopecia diagnosed in three mice. Animals treated with ACA had higher VEGF plasma levels than untreated animals which could cause improved tumor vascularization in the longer term and thus increased sensitivity to hematogenous therapies such as chemotherapy. Intratibial oxygen measurements of the healthy contralateral leg showed no significant differences between the experimental groups.

ACA is one of the members of the EISA (enzyme-induced self-assembly) family that has been successfully applied *in vitro* and *in vivo*, in which high hopes of precision nanomedicine have been placed in recent years. After optimization and establishment of the extended murine model, the next step could be the transfer to a canine large animal model to improve clinical comparability to humans. In addition, such studies of canine osteosarcoma therapy could open new doors. This strategy could pave the way for a long-desired tumor cell-directed and more gentle therapy that enhances the quality of life and survival of human and canine patients.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Aboulafia, A. J., F. Brooks, J. Piratzky und S. Weiss, 1999: Osteosarcoma arising from heterotopic ossification after an electrical burn. A case report. *JBJS Case Connector*, 564-570.

Asano, T. und E. S. Kleinerman, 1993: Liposome-encapsulated MTP-PE: a novel biologic agent for cancer therapy. *Journal of immunotherapy*, **14**, 286-292.

Ashton, J. A., J. P. Farese, R. J. Milner, L. M. Lee-Ambrose und J. M. v. Gilder, 2005: Investigation of the effect of pamidronate disodium on the in vitro viability of osteosarcoma cells from dogs. *American journal of veterinary research*, **66**, 885-891.

Bacci, G., P. Ruggieri, P. Picci, A. Briccoli, A. Ferraro, S. Ferrari, A. Tienghi, D. Iantorno und M. Campanacci, 1995: Changing pattern of relapse in osteosarcoma of the extremities treated with adjuvant and neoadjuvant chemotherapy. *Journal of chemotherapy*, **7**, 230-239.

Bacon, N. J., N. P. Ehrhart, W. S. Dernell, M. Lafferty und S. J. Withrow, 2008: Use of alternating administration of carboplatin and doxorubicin in dogs with microscopic metastases after amputation for appendicular osteosarcoma: 50 cases (1999–2006). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **232**, 1504-1510.

Bailey, D., H. Erb, L. Williams, D. Ruslander und M. Hauck, 2003: Carboplatin and doxorubicin combination chemotherapy for the treatment of appendicular osteosarcoma in the dog. *Journal of veterinary internal medicine*, **17**, 199-205.

Barger, A., R. Graca, K. Bailey, J. Messick, L.-P. de Lorimier, T. Fan und W. Hoffmann, 2005: Use of alkaline phosphatase staining to differentiate canine osteosarcoma from other vimentin-positive tumors. *Veterinary pathology*, **42**, 161-165.

Barnard, S. M., R. M. Zuber und A. S. Moore, 2007: Samarium Sm 153 lexidronam for the palliative treatment of dogs with primary bone tumors: 35 cases (1999–2005). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **230**, 1877-1881.

Batschinski, K., N. Dervisis und B. Kitchell, 2011: Evaluation of ifosfamide rescue therapy for metastatic canine osteosarcoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, **9**, e11-e12.

- Belanger, J. M., T. P. Bellumori, D. L. Bannasch, T. R. Famula und A. M. Oberbauer, 2017: Correlation of neuter status and expression of heritable disorders. *Canine Genetics and Epidemiology*, **4**, 6.
- Belli, L., S. Scholl, A. Livartowski, M. Ashby, T. Palangie, P. Levasseur und P. Pouillart, 1989: Resection of pulmonary metastases in osteosarcoma. A retrospective analysis of 44 patients. *Cancer*, **63**, 2546-2550.
- Bensted, J., N. Blackett und L. Lamerton, 1961: Histological and dosimetric considerations of bone tumour production with radioactive phosphorus. *The British Journal of Radiology*, **34**, 160-175.
- Bentzen, S., H. Poulsen, S. Kaae, O. Myhre Jensen, H. Johansen, H. Mouridsen, S. Daugaard und C. Arnoldi, 1988: Prognostic factors in osteosarcomas. A regression analysis. *Cancer*, **62**, 194-202.
- Berg, J., 1996: Canine osteosarcoma: amputation and chemotherapy. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **26**, 111-121.
- Berg, J., M. C. Gebhardt und W. M. Rand, 1997: Effect of timing of postoperative chemotherapy on survival of dogs with osteosarcoma. *Cancer*, **79**, 1343-1350.
- Berg, J., M. Weinstein, D. Springfield und W. Rand, 1995: Results of surgery and doxorubicin chemotherapy in dogs with osteosarcoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **206**, 1555-1560.
- Berg, J. M., L. Stryer und J. L. Tymoczko, 2015: *Stryer Biochemie*. Springer-Verlag.
- Bergman, P. J., E. G. MacEwen, I. D. Kurzman, C. J. Henry, A. S. Hammer, D. W. Knapp, A. Hale, S. A. Kruth, M. K. Klein und J. Klausner, 1996: Amputation and carboplatin for treatment of dogs with osteosarcoma: 48 cases (1991 to 1993). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **10**, 76-81.
- Bertout, J. A., S. A. Patel und M. C. Simon, 2008: The impact of O2 availability on human cancer. *Nature Reviews Cancer*, **8**, 967.
- Bianchi, L., A. Böcking, N. Böhm, B. Christ, U. Costabel, M. Deckert, H. Denk, H. Drexler, N. Freudenberg, L. Füzesi, U. V. Gerlach, H. H. Goebel, A. v. Herbay, E. W. Herbst, W.-W. Höpker, C. Ihling, E. Kaiserling, G. Klöppel, G. Krekeler, A. Marx, W. Mohr, H. Müller, H. K. Müller-Hermelink,

H. Müntefering, M. J. Oberholzer, A. J. Olah, H.-H. Peter, H.-J. Radzun, G. Reifenberger, U.-N. Riede, R. Rohrbach, T. Rüdiger, H.-J. Rumpelt, W. Saeger, G. Sauter, H.-E. Schaefer, W. Schlote, O. Schmid, W. Sterry, S. Störkel, M. Stolte, D. R. Thal, J. Torhorst, A. Walch, M. Werner, O. D. Wiestler und C. Wittekind, 2004: Allgemeine und spezielle Pathologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Bielack, S. S., B. Kempf-Bielack, G. Delling, G. U. Exner, S. Flege, K. Helmke, R. Kotz, M. Salzer-Kuntschik, M. Werner und W. Winkelmann, 2002: Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *Journal of Clinical Oncology*, **20**, 776-790.

Bieling, P., S. Bielack, G. Delling, H. Jürgens, R. Kotz, C. Dose, H. Astheimer, G. Exner, H. Gadner und N. Graf, 1991: Neoadjuvante Chemotherapie des Osteosarkoms. *Klinische Pädiatrie*, **203**, 220-230.

Biller, B., A. Guth, J. Burton und S. Dow, 2010: Decreased ratio of CD8+ T cells to regulatory T cells associated with decreased survival in dogs with osteosarcoma. *Journal of veterinary internal medicine*, **24**, 1118-1123.

Bjørnland, K., K. Flatmark, S. Pettersen, A. O. Aasen, Ø. Fodstad und G. M. Mælandsmo, 2005: Matrix metalloproteinases participate in osteosarcoma invasion. *Journal of Surgical Research*, **127**, 151-156.

Boerman, I., G. T. Selvarajah, M. Nielen und J. Kirpensteijn, 2012: Prognostic factors in canine appendicular osteosarcoma—a meta-analysis. *BMC veterinary research*, **8**, 56.

Boston, S. E., F. Duerr, N. Bacon, S. Larue, E. J. Ehrhart und S. Withrow, 2007: Intraoperative radiation for limb sparing of the distal aspect of the radius without transcarpal plating in five dogs. *Veterinary surgery*, **36**, 314-323.

Boston, S. E., N. P. Ehrhart, W. S. Dernell, M. Lafferty und S. J. Withrow, 2006: Evaluation of survival time in dogs with stage III osteosarcoma that undergo treatment: 90 cases (1985–2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **228**, 1905-1908.

Botter, S. M., M. J. Arlt, W. Born und B. Fuchs, 2014: Mammalian models of bone sarcomas. *Bone Cancer: Primary Bone Cancers and Bone Metastases*, 349.

- Brekken, C., Ø. S. Bruland und D. C. de Lange, 1999: Interstitial fluid pressure in human osteosarcoma xenografts: significance of implantation site and the response to intratumoral injection of hyaluronidase. *Anticancer research*, **20**, 3503-3512.
- Brewer, G. J., R. D. Dick, V. Yuzbasiyan-Gurkin, R. Tankanow, A. B. Young und K. J. Kluin, 1991: Initial therapy of patients with Wilson's disease with tetrathiomolybdate. *Archives of Neurology*, **48**, 42-47.
- Bright, R., 1981: Reconstruction of thoracic wall defects using Marlex mesh. *The Journal of the American Animal Hospital Association (USA)*.
- Brighton, C. T. und R. B. Heppenstall, 1971: Oxygen Tension in Zones of the Epiphyseal Plate, the Metaphysis and Diaphysis: AN in Vitro AND in Viro STUDY IN RATS AND RABBITS. *JBJS*, **53**, 719-728.
- Britt, T., C. Clifford, A. Barger, S. Moroff, K. Drobatz, C. Thacher und G. Davis, 2007: Diagnosing appendicular osteosarcoma with ultrasound-guided fine-needle aspiration: 36 cases. *Journal of Small Animal Practice*, **48**, 145-150.
- Broadhead, M., C. Dass und P. Choong, 2011: Systemically administered PEDF against primary and secondary tumours in a clinically relevant osteosarcoma model. *British journal of cancer*, **105**, 1503-1511.
- Broadhead, M. L., P. F. Choong und C. R. Dass, 2012: Efficacy of continuously administered PEDF-derived synthetic peptides against osteosarcoma growth and metastasis. *BioMed Research International*, **2012**.
- Broadhead, M. L., Z. Lokmic, M. L. Tan, A. Stevenson, D. S. Binns, C. Cullinane, R. J. Hicks, P. F. Choong und D. E. Myers, 2015: Applying advanced imaging techniques to a murine model of orthotopic osteosarcoma. *Frontiers in surgery*, **2**.
- Brodey, R., R. Sauer und W. Medway, 1963: Canine bone neoplasms. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **143**, 471.
- Brodey, R. S. und W. H. Riser, 1969: 7 Canine Osteosarcoma: A Clinicopathologic Study of 194 Cases. *Clinical orthopaedics and related research*, **62**, 54-64.

- Brunschwig, A., 1938: Production of primary bone tumors (Fibrosarcoma of Bone) by intramedullary injection of methylcholanthrene. *The American Journal of Cancer*, **34**, 540-542.
- Buracco, P., E. Morello, M. Martano und M. E. Vasconi, 2002: Pasteurized tumoral autograft as a novel procedure for limb sparing in the dog: a clinical report. *Veterinary Surgery*, **31**, 525-532.
- Cairns, R. A. und R. P. Hill, 2004: Acute hypoxia enhances spontaneous lymph node metastasis in an orthotopic murine model of human cervical carcinoma. *Cancer research*, **64**, 2054-2061.
- Cairns, R. A., T. Kalliomaki und R. P. Hill, 2001: Acute (cyclic) hypoxia enhances spontaneous metastasis of KHT murine tumors. *Cancer research*, **61**, 8903-8908.
- Calhoun, J. H. und J. T. Mader, 1989: Antibiotic beads in the management of surgical infections. *The American journal of surgery*, **157**, 443-449.
- Checkley, S., L. MacCallum, J. Yates, P. Jasper, H. Luo, J. Tolsma und C. Bendtsen, 2015: Bridging the gap between in vitro and in vivo: Dose and schedule predictions for the ATR inhibitor AZD6738. *Scientific Reports*, **5**, 13545.
- Cherrier, B., F. Gouin, M.-F. Heymann, J. Thiéry, F. Rédini, D. Heymann und F. Duteille, 2005: A new experimental rat model of osteosarcoma established by intrafemoral tumor cell inoculation, useful for biology and therapy investigations. *Tumor Biology*, **26**, 121-130.
- Cobb, L., 1970: Radiation-induced osteosarcoma in the rat as a model for osteosarcoma in man. *British journal of cancer*, **24**, 294.
- Colliard, L., J. Ancel, J.-J. Benet, B.-M. Paragon und G. Blanchard, 2006: Risk factors for obesity in dogs in France. *The Journal of nutrition*, **136**, 1951S-1954S.
- Cong, Y., Z. Y. Qiao und H. Wang, 2018: Molecular Self-Assembly Constructed in Physiological Conditions for Cancer Diagnosis and Therapy. *Advanced Therapeutics*, 1800067.
- Cooley, D. und D. Waters, 1997: Skeletal neoplasms of small dogs: a retrospective study and literature review. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **33**, 11-23.

Cooley, D. M., B. C. Beranek, D. L. Schlittler, N. W. Glickman, L. T. Glickman und D. J. Waters, 2002: Endogenous gonadal hormone exposure and bone sarcoma risk. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, **11**, 1434-1440.

Coomber, B. L., J. Denton, A. Sylvestre und S. Kruth, 1998: Blood vessel density in canine osteosarcoma. *Canadian journal of veterinary research*, **62**, 199.

Coomer, A., J. Farese, R. Milner, J. Liptak, N. Bacon und D. Lurie, 2009: Radiation therapy for canine appendicular osteosarcoma. *Veterinary and comparative oncology*, **7**, 15-27.

Cox, C., T. N. Teknos, M. Barrios, G. J. Brewer, R. D. Dick und S. D. Merajver, 2001: The role of copper suppression as an antiangiogenic strategy in head and neck squamous cell carcinoma. *The Laryngoscope*, **111**, 696-701.

Dass, C. R., E. T. Ek, K. G. Contreras und P. F. Choong, 2006: A novel orthotopic murine model provides insights into cellular and molecular characteristics contributing to human osteosarcoma. *Clinical & experimental metastasis*, **23**, 367-380.

de la Riva, G. T., B. L. Hart, T. B. Farver, A. M. Oberbauer, L. L. M. Messam, N. Willits und L. A. Hart, 2013: Neutering dogs: effects on joint disorders and cancers in golden retrievers. *PloS one*, **8**, e55937.

De Maria, R., S. Miretti, S. Iussich, M. Olivero, E. Morello, A. Bertotti, J. G. Christensen, B. Biolatti, R. A. Levine und P. Buracco, 2009: met oncogene activation qualifies spontaneous canine osteosarcoma as a suitable pre-clinical model of human osteosarcoma. *The Journal of pathology*, **218**, 399-408.

Debatin, K.-M., D. Poncet und G. Kroemer, 2002: Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene*, **21**, 8786.

Denko, N. C., 2008: Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature Reviews Cancer*, **8**, 705-713.

DeRegis, C. J., A. S. Moore, W. M. Rand und J. Berg, 2003: Cisplatin and doxorubicin toxicosis in dogs with osteosarcoma. *Journal of veterinary internal medicine*, **17**, 668-673.

Dernell, W., N. Ehrhart, R. Straw und D. Vail, 2001: Tumors of the skeletal system. *Small animal clinical oncology*, **3**, 378-417.

Dernell, W., R. Straw, M. Cooper, B. Powers, S. LaRue und S. Withrow, 1998: Multilobular osteochondrosarcoma in 39 dogs: 1979-1993. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **34**, 11-18.

Dernell, W. W., SJ; Kuntz, CA; et al., 1999: *Evaluation of hyperthermic isolated limb perfusion using cisplatin in normal dogs.*

.

DeVita Jr, V., S. Hellman und S. Rosenberg, 1997: Cancer: Principles and Practice of Oncology, Lippincott Raven. *Philadelphia, PA.*

Dickerson, M. E., R. L. Page, T. A. LaDue, M. L. Hauck, D. E. Thrall, M. E. Stebbins und G. S. Price, 2001: Retrospective analysis of axial skeleton osteosarcoma in 22 large-breed dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, **15**, 120-124.

Dickinson, P. J., M. C. McEntee, D. Lipsitz, K. Keel und R. A. Lecouteur, 2001: Radiation induced vertebral osteosarcoma following treatment of an intradural extramedullary spinal cord tumor in a dog. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, **42**, 463-470.

Dieckmann, R., A. Streitbürger, M. Balke, M.-P. Henrichs, M. Nottrott, G. Gosheger und J. Harges, 2010: Modulare endoprothetische Rekonstruktion bei malignen Knochentumoren. *OP-JOURNAL*, **26**, 186-190.

Dieckmann, S., 2008: Zum Osteosarkom: eine vergleichende Literaturstudie.

Dietz, A., V. Rudat, B. Vanselow, P. Wollensack, C. Bettscheider, C. Conradt und M. J. Eble, 1999: Rise of oxygenation in cervical lymph node metastasis during the initial course of radiochemotherapy. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, **121**, 789-796.

DiResta, G. R., S. W. Aiken, H. K. Brown, P. J. Bergman, A. Hohenhaus und J. H. Healey, 2008: Influence of carboplatin infusion on osteosarcoma blood flow. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, **62**, 545-549.

- Downey, R. J., 1999: Surgical treatment of pulmonary metastases. *Surg Oncol Clin N Am*, **8**, 341.
- Du, X., J. Zhou, H. Wang, J. Shi, Y. Kuang, W. Zeng, Z. Yang und B. Xu, 2017: In situ generated D-peptidic nanofibrils as multifaceted apoptotic inducers to target cancer cells. *Cell Death & Disease*, **8**, e2614.
- Dunn, A., E. Buffa, D. Hanshaw und M. Farrell, 2012: Osteosarcoma at the site of titanium orthopaedic implants in a dog. *Australian veterinary journal*, **90**, 39-43.
- Dunn, T. B. und H. B. Andervont, 1963: Histology of some neoplasms and non-neo-plastic lesions found in wild mice maintained under laboratory conditions. *Journal of the National Cancer Institute*, **31**, 873-901.
- Dvorak, H. F., 2002: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of clinical oncology*, **20**, 4368-4380.
- Egenvall, A., A. Nødtvedt und H. von Euler, 2007: Bone tumors in a population of 400 000 insured Swedish dogs up to 10 y of age: incidence and survival. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **71**, 292.
- Ehrhart, N., 2005: Longitudinal bone transport for treatment of primary bone tumors in dogs: technique description and outcome in 9 dogs. *Veterinary surgery*, **34**, 24-34.
- Ehrhart, N., W. Dernell, W. Hoffmann, R. Weigel, B. Powers und S. Withrow, 1998: Prognostic importance of alkaline phosphatase activity in serum from dogs with appendicular osteosarcoma: 75 cases (1990-1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **213**, 1002-1006.
- Ek, E. T., C. R. Dass und P. F. Choong, 2006: Commonly used mouse models of osteosarcoma. *Critical reviews in oncology/hematology*, **60**, 1-8.
- Ellender, J. H., H. Pottinger, JM Thomas, M, 2001: Induction of osteosarcoma and acute myeloid leukaemia in CBA/H mice by the alpha-emitting nuclides, uranium-233, plutonium-239 and americium-241. *International journal of radiation biology*, **77**, 41-52.

Endrich, B. und P. Vaupel, 1998: *The role of the microcirculation in the treatment of malignant tumors: facts and fiction*. Springer-Verlag, Berlin.

Enneking, W. F., 1989: Musculoskeletal tumor staging: 1988 update. *Cancer Treat Res*, **44**, 39-49.

Enneking, W. F., S. S. Spanier und M. A. Goodman, 1980: A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, **153**, 106-120.

Entz-Werle, N., M. P. Gaub, T. Lavaux, L. Marcellin, N. Metzger, P. Marec-Berard, C. Schmitt, L. Brugiere, C. Kalifa und M. D. Tabone, 2007: KIT gene in pediatric osteosarcomas: could it be a new therapeutic target? *International journal of cancer*, **120**, 2510-2516.

Evans, L., 1983: Osteosarcoma in a young Great Dane dog. *Journal of the South African Veterinary Association*, **54**, 271-273.

Fan, T., L. De Lorimier, L. Garrett und H. Lacoste, 2008: The bone biologic effects of zoledronate in healthy dogs and dogs with malignant osteolysis. *Journal of veterinary internal medicine*, **22**, 380-387.

Fan, T. M., 2010: Animal models of osteosarcoma. *Expert review of anticancer therapy*, **10**, 1327-1338.

Fan, T. M., L. P. Lorimier, S. C. Charney und J. G. Hintermeister, 2005: Evaluation of intravenous pamidronate administration in 33 cancer-bearing dogs with primary or secondary bone involvement. *Journal of veterinary internal medicine*, **19**, 74-80.

Fan, T. M., L. P. Lorimier, K. O'Dell-Anderson, H. I. Lacoste und S. C. Charney, 2007: Single-agent pamidronate for palliative therapy of canine appendicular osteosarcoma bone pain. *Journal of veterinary internal medicine*, **21**, 431-439.

Farcas, N., B. Arzi und F. Verstraete, 2014: Oral and maxillofacial osteosarcoma in dogs: a review. *Veterinary and comparative oncology*, **12**, 169-180.

Farese, J. P., R. Milner, M. S. Thompson, N. Lester, K. Cooke, L. Fox, J. Hester und F. J. Bova, 2004: Stereotactic radiosurgery for treatment of osteosarcomas involving the distal portions of the limbs in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **225**, 1567-1572.

- Feeney, D., G. Johnston, C. Grindem, J. Toombs, D. Caywood und G. Hanlon, 1982: Malignant neoplasia of canine ribs: clinical, radiographic, and pathologic findings. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **180**, 927-933.
- Feng, Z., H. Wang, S. Wang, Q. Zhang, X. Zhang, A. A. Rodal und B. Xu, 2018: Enzymatic Assemblies Disrupt the Membrane and Target Endoplasmic Reticulum for Selective Cancer Cell Death. *Journal of the American Chemical Society*, **140**, 9566-9573.
- Feng, Z., H. Wang, R. Zhou, J. Li und B. Xu, 2017: Enzyme-instructed assembly and disassembly processes for targeting downregulation in cancer cells. *Journal of the American Chemical Society*, **139**, 3950-3953.
- Fenger, J. M., C. A. London und W. C. Kisseberth, 2014: Canine osteosarcoma: a naturally occurring disease to inform pediatric oncology. *ILAR Journal*, **55**, 69-85.
- Ferracini, R., P. Angelini, E. Cagliero, A. Linari, M. Martano, J. Wunder und P. Buracco, 2000: MET oncogene aberrant expression in canine osteosarcoma. *Journal of Orthopaedic Research*, **18**, 253-256.
- Ferrari, C., M. Benassi, F. Ponticelli, G. Gamberi, P. Ragazzini, L. Pazzaglia, A. Ballardelli, F. Bertoni und P. Picci, 2004: Role of MMP-9 and its tissue inhibitor TIMP-1 in human osteosarcoma Findings in 42 patients followed for 1–16 years. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, **75**, 487-491.
- Fieten, H., B. Spee, J. Ijzer, M. Kik, L. Penning und J. Kirpensteijn, 2009: Expression of hepatocyte growth factor and the proto-oncogenic receptor c-Met in canine osteosarcoma. *Veterinary pathology*, **46**, 869-877.
- Fletcher, C. D., K. K. Unni und F. Mertens, 2002: *Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone*. Iarc.
- Fletcher, D. A. und R. D. Mullins, 2010: Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, **463**, 485.
- Flint, A., L. U'ren, M. Legare, S. Withrow, W. Dernell und W. Hanneman, 2004: Overexpression of the erbB-2 proto-oncogene in canine osteosarcoma cell lines and tumors. *Veterinary pathology*, **41**, 291-296.

Folkman, J., 1990: What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, **82**, 4-7.

Forrest, L. J. und D. E. Thrall, 1994: Bone scintigraphy for metastasis detection in canine osteosarcoma. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, **35**, 124-130.

Foukas, A., N. Deshmukh, R. Grimer, D. Mangham, E. Mangos und S. Taylor, 2002: Stage-IIIB osteosarcomas around the knee: a study of MMP-9 in surviving tumour cells. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, **84**, 706-711.

Frede, S., U. Berchner-Pfannschmidt und J. Fandrey, 2007: Regulation of hypoxia-inducible factors during inflammation. *Methods in enzymology*, **435**, 403-419.

Freyschmidt, J., H. Ostertag und G. Jundt, 2010: *Knochtumoren mit Kiefertumoren*. Springer Berlin Heidelberg.

Frith, C. H., B. P. Johnson und B. Highman, 1982: Osteosarcomas in BALB/c female mice. *Laboratory Animal Science*, **32**, 60-63.

Fuchs, B. und D. J. Pritchard, 2002: Etiology of osteosarcoma. *Clinical orthopaedics and related research*, **397**, 40-52.

Gallegos, J., T. Schwarz und J. F. McNulty, 2008: Massive midline occipitotemporal resection of the skull for treatment of multilobular osteochondrosarcoma in two dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **233**, 752-757.

Gamblin, R. M., R. C. Straw, B. E. Powers, R. D. Park, M. M. Bunge und S. J. Withrow, 1995: Primary osteosarcoma distal to the antebrachiocondylar and tarsocrural joints in nine dogs (1980-1992). *Journal of the American Animal Hospital Association*, **31**, 86-91.

Gao, Y., Y. Kuang, Z.-F. Guo, Z. Guo, I. J. Krauss und B. Xu, 2009: Enzyme-instructed molecular self-assembly confers nanofibers and a supramolecular hydrogel of taxol derivative. *Journal of the American Chemical Society*, **131**, 13576-13577.

Garzotto, C. K., J. Berg, W. E. Hoffmann und W. M. Rand, 2000: Prognostic significance of serum alkaline phosphatase activity in canine appendicular osteosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **14**, 587-592.

Gebert, C., J. Harges, C. Hoffmann, W. Winkelmann und G. Gosheger, 2002: Chirurgische Therapieoptionen bei malignen Knochentumoren. *Der Chirurg*, **73**, 1162-1169.

Gellasch, K. L., V. L. Kalscheur, M. K. Clayton und P. Muir, 2002: Fatigue microdamage in the radial predilection site for osteosarcoma in dogs. *American journal of veterinary research*, **63**, 896-899.

German, A. J., 2006: The growing problem of obesity in dogs and cats. *The Journal of Nutrition*, **136**, 1940S-1946S.

Giaccia, A., B. G. Siim und R. S. Johnson, 2003: HIF-1 as a target for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2**, 803-811.

GIBBS, C., H. Denny und D. Kelly, 1984: The radiological features of osteosarcoma of the appendicular skeleton in dogs: a review of 74 cases. *Journal of Small Animal Practice*, **25**, 177-192.

GIBBS, C., H. Denny und V. Lucke, 1985: The radiological features of non-osteogenic malignant tumours of bone in the appendicular skeleton of the dog: a review of thirty-four cases. *Journal of Small Animal Practice*, **26**, 537-553.

Gillette, S. M., E. L. Gillette, B. E. Powers und S. J. Withrow, 1990: Radiation-induced osteosarcoma in dogs after external beam or intraoperative radiation therapy. *Cancer research*, **50**, 54-57.

Goorin, A. M., H. T. Abelson und E. Frei III, 1985: Osteosarcoma: fifteen years later. *New England Journal of Medicine*, **313**, 1637-1643.

Gorman, E., A. M. Barger, J. M. Wypij und M. E. Pinkerton, 2006: Cutaneous metastasis of primary appendicular osteosarcoma in a dog. *Veterinary clinical pathology*, **35**, 358-361.

Gösling, T., U. Brunnemer, F. Länger, H. Rosenthal und C. Krettek, 2010: Primäre Knochentumoren—allgemeine Grundlagen. *OP-JOURNAL*, **26**, 162-170.

Greenberg, D. B., A. Goorin, M. C. Gebhardt, L. Gupta, N. Stier, D. Harmon und H. Mankin, 1994: Quality of life in osteosarcoma survivors. *Oncology (Williston Park, NY)*, **8**, 19-25; discussion 25-16, 32, 35.

Gressner, A. M. und T. Arndt, 2013: *Lexikon der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer-Verlag.

Group, F. B. T. S., 1988: Age and dose of chemotherapy as major prognostic factors in a trial of adjuvant therapy of osteosarcoma combining two alternating drug combinations and early prophylactic lung irradiation. *Cancer*, **61**, 1304-1311.

Grundmann, E., A. Roessner, W. Schlake, M. Immenkamp, P. Preusser, G. Wüst, J. Ritter und E. Schnepfer, 1983: Combined ultrastructural, histochemical, and autoradiographic study of osteosarcoma after preoperative chemotherapy according to the COSS 80 protocol. *Journal of cancer research and clinical oncology*, **106**, 25-31.

Guijarro, M. V., S. C. Ghivizzani und C. P. Gibbs, 2014: Animal Models in Osteosarcoma. *Frontiers in Oncology*, **4**, 189.

Guma, S. R., D. A. Lee, L. Yu, N. Gordon, D. Hughes, J. Stewart, W. L. Wang und E. S. Kleinerman, 2014: Natural killer cell therapy and aerosol interleukin-2 for the treatment of osteosarcoma lung metastasis. *Pediatric blood & cancer*, **61**, 618-626.

Hahn, K., D. Frazier, S. Cox und A. Legendre, 1997: Effect of infusion regime on doxorubicin pharmacokinetics in the cat. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **33**, 427-433.

Hahn, K., R. Richardson, E. Blevins, S. Lenz und D. Knapp, 1996: Intramedullary cisplatin chemotherapy: experience in four dogs with osteosarcoma. *Journal of small animal practice*, **37**, 187-192.

Halfacree, Z. J., S. J. Baines, V. J. Lipscomb, J. Grierson, B. A. Summers und D. J. Brockman, 2007: Use of a Latissimus Dorsi Myocutaneous Flap for One-Stage Reconstruction of the Thoracic Wall After En bloc Resection of Primary Rib Chondrosarcoma in Five Dogs. *Veterinary surgery*, **36**, 587-592.

Hall, E. J. und A. J. Giaccia, 2006: *Radiobiology for the Radiologist*. Lippincott Williams & Wilkins.

- Hammer, A. S., F. R. Weeren, S. E. Weisbrode und S. L. Padgett, 1995: Prognostic factors in dogs with osteosarcomas of the flat or irregular bones. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **31**, 321-326.
- Harasen, G. und E. Simko, 2008: Histiocytic sarcoma of the stifle in a dog with cranial cruciate ligament failure and TPLO treatment. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology (VCOT)*, **21**, 375-377.
- Hardy, W., R. Brodey und W. Riser, 1967: Osteosarcoma of the canine skull. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, **8**, 5-16.
- Harris, A. L., 2002: Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews Cancer*, **2**, 38-47.
- Harris, H., 1990: The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clinica chimica acta*, **186**, 133-150.
- Harris, M. B., P. Gieser, A. M. Goorin, A. Ayala, S. J. Shochat, W. S. Ferguson, T. Holbrook und M. P. Link, 1998: Treatment of metastatic osteosarcoma at diagnosis: a Pediatric Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology*, **16**, 3641-3648.
- Hart, B. L., L. A. Hart, A. P. Thigpen und N. H. Willits, 2014: Long-term health effects of neutering dogs: comparison of Labrador Retrievers with Golden Retrievers. *PloS one*, **9**, e102241.
- Henrichs, M.-P., A. Streitbürger, R. Dieckmann, M. Nottrott, G. Gosheger und J. Hardes, 2010: Die Biopsie von Knochentumoren. *OP-JOURNAL*, **26**, 172-176.
- Hermanns, W., 2015: Tumorpathologie 1. Vet LMU Pathologie.
- Hernigou, P., J. Thiery, J. Benoit, M. Voisin, P. Leroux, G. Hagege, G. Delepine und D. Goutallier, 1989: Methotrexate diffusion from acrylic cement. Local chemotherapy for bone tumours. *Bone & Joint Journal*, **71**, 804-811.
- Heyman, S. J., D. L. DIFENDERFER, M. H. GOLDSCHMIDT und C. D. NEWTON, 1992: Canine axial skeletal osteosarcoma a retrospective study of 116 cases (1986 to 1989). *Veterinary Surgery*, **21**, 304-310.

Hillers, K. R., W. S. Dernell, M. H. Lafferty, S. J. Withrow und S. E. Lana, 2005: Incidence and prognostic importance of lymph node metastases in dogs with appendicular osteosarcoma: 228 cases (1986–2003). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **226**, 1364-1367.

Histing, T., P. Garcia, J. Holstein, M. Klein, R. Matthys, R. Nuetzi, R. Steck, M. Laschke, T. Wehner und R. Bindl, 2011: Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone*, **49**, 591-599.

Höckel, M., K. Schlenger, M. Mitze, U. Schäffer und P. Vaupel, Hypoxia and radiation response in human tumors. in *Proceedings of the Seminars in radiation oncology*, 1996, p. 3-9.

Hockel, M. und P. Vaupel, 2001: Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute*, **93**, 266-276.

Holdener, E., 1985: Grundlagen der medikamentösen Krebstherapie. *Internistische Krebstherapie*. Springer.

Holmberg, B. J., J. P. Farese, D. Taylor und E. W. Uhl, 2004: Osteosarcoma of the humeral head associated with osteochondritis dissecans in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **40**, 246-249.

Hong, S. H., J. Briggs, R. Newman, K. Hoffman, A. Mendoza, D. LeRoith, L. Helman, S. Yakar und C. Khanna, 2009: Murine osteosarcoma primary tumour growth and metastatic progression is maintained after marked suppression of serum insulin-like growth factor I. *International Journal of Cancer*, **124**, 2042-2049.

Huang, P., Y. Gao, J. Lin, H. Hu, H.-S. Liao, X. Yan, Y. Tang, A. Jin, J. Song und G. Niu, 2015: Tumor-specific formation of enzyme-instructed supramolecular self-assemblies as cancer theranostics. *ACS nano*, **9**, 9517-9527.

Huang, Z. und Y. Gao, 2018: Enzyme-Instructed Self-assembly of Small Peptides In Vivo for Biomedical Application. In: H. Wang and L.-L. Li (eds.), *In Vivo Self-Assembly Nanotechnology for Biomedical Applications*. Springer Singapore, Singapore.

Huland, E., H. Heinzer, R. Jörres, D. Loppow und H. Huland, 2004: Therapeutic approaches in metastatic renal cell carcinoma: local immunotherapy. *Der Urologe*, **43**, 140-144.

- Il'yasova, D., L. H. Colbert, T. B. Harris, A. B. Newman, D. C. Bauer, S. Satterfield und S. B. Kritchevsky, 2005: Circulating Levels of Inflammatory Markers and Cancer Risk in the Health Aging and Body Composition Cohort. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, **14**, 2413-2418.
- Imbach, P., T. Kühne und R. J. Arceci, 2014: *Kompendium Kinderonkologie*. Springer-Verlag.
- Janeway, K. A. und C. R. Walkley, 2010: Modeling human osteosarcoma in the mouse: From bedside to bench. *Bone*, **47**, 859-865.
- Jankowski, M., P. Steyn, S. Lana, W. Dernell, C. Blom, J. Uhrig, M. Lafferty und S. Withrow, 2003: Nuclear scanning with 99mTc-HDP for the initial evaluation of osseous metastasis in canine osteosarcoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, **1**, 152-158.
- Jaroensong, T., Y. Endo, S. J. Lee, A. Kamida, M. Mochizuki, R. Nishimura, N. Sasaki und T. Nakagawa, 2012: Effects of transplantation sites on tumour growth, pulmonary metastasis and ezrin expression of canine osteosarcoma cell lines in nude mice. *Veterinary and comparative oncology*, **10**, 274-282.
- Jewell, U. R., I. KVIETIKOVA, A. SCHEID, C. BAUER, R. H. WENGER und M. GASSMANN, 2001: Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *The FASEB Journal*, **15**, 1312-1314.
- Jiang, B.-H., G. L. Semenza, C. Bauer und H. H. Marti, 1996: Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **271**, C1172-C1180.
- Jongeward, S. J., 1985: Primary bone tumors. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **15**, 609-641.
- Jonsson, K. B., A. Frost, O. Nilsson, S. Ljunghall und Ö. Ljunggren, 1999: Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells: a comparison. *Acta orthopaedica Scandinavica*, **70**, 365-373.
- Kaelin, W. G., 2002: How oxygen makes its presence felt. *Genes & development*, **16**, 1441-1445.

Kalafatovic, D., M. Nobis, J. Son, K. I. Anderson und R. V. Ulijn, 2016: MMP-9 triggered self-assembly of doxorubicin nanofiber depots halts tumor growth. *Biomaterials*, **98**, 192-202.

Kansara, M., M. Tsang, L. Kodjabachian, N. A. Sims, M. K. Trivett, M. Ehrich, A. Dobrovic, J. Slavin, P. F. Choong und P. J. Simmons, 2009: Wnt inhibitory factor 1 is epigenetically silenced in human osteosarcoma, and targeted disruption accelerates osteosarcomagenesis in mice. *The Journal of clinical investigation*, **119**, 837.

Kavirayani, A. M., J. P. Sundberg und O. Foreman, 2011: Primary Neoplasms of Bones in Mice. *Veterinary Pathology*, **49**, 182-205.

Kent, M. S., A. Strom, C. A. London und B. Seguin, 2004: Alternating carboplatin and doxorubicin as adjunctive chemotherapy to amputation or limb-sparing surgery in the treatment of appendicular osteosarcoma in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, **18**, 540-544.

Kessler, M. und M. Ammer, 2013: *Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katze*. Enke.

Keyes, K. A., L. Mann, K. Cox, P. Treadway, P. Iversen, Y.-F. Chen und B. A. Teicher, 2003: Circulating angiogenic growth factor levels in mice bearing human tumors using Luminex Multiplex technology. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, **51**, 321-327.

Keyes, K. A., L. Mann, M. Sherman, E. Galbreath, L. Schirtzinger, D. Ballard, Y.-F. Chen, P. Iversen und B. A. Teicher, 2004: LY317615 decreases plasma VEGF levels in human tumor xenograft-bearing mice. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, **53**, 133-140.

Khan, M. K., M. W. Miller, J. Taylor, N. K. Gill, R. D. Dick, K. Van Goled, G. J. Brewert und S. D. Merajver, 2002: Radiotherapy and antiangiogenic TM in lung cancer. *Neoplasia*, **4**, 164-170.

Khanna, C., J. Khan, P. Nguyen, J. Prehn, J. Caylor, C. Yeung, J. Trepel und P. Meltzer, 2001: Metastasis-associated differences in gene expression in a murine model of osteosarcoma. *Cancer Research*, **61**, 3750-3759.

Khanna, C., J. Prehn, C. Yeung, J. Caylor, M. Tsokos und L. Helman, 2000: An orthotopic model of murine osteosarcoma with clonally related variants differing in pulmonary metastatic potential. *Clinical & experimental metastasis*, **18**, 261-271.

Khanna, C., X. Wan, S. Bose, R. Cassaday, O. Olomu, A. Mendoza, C. Yeung, R. Gorlick, S. M. Hewitt und L. J. Helman, 2004: The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nature medicine*, **10**, 182.

Kim, S. Y. und L. J. Helman, 2009: Strategies to explore new approaches in the investigation and treatment of osteosarcoma. *Pediatric and Adolescent Osteosarcoma*. Springer.

Kim, S. Y., C. H. Lee, B. V. Midura, C. Yeung, A. Mendoza, S. H. Hong, L. Ren, D. Wong, W. Korz und A. Merzouk, 2008: Inhibition of the CXCR4/CXCL12 chemokine pathway reduces the development of murine pulmonary metastases. *Clinical & experimental metastasis*, **25**, 201-211.

Kirkness, E. F., V. Bafna, A. L. Halpern, S. Levy, K. Remington, D. B. Rusch, A. L. Delcher, M. Pop, W. Wang und C. M. Fraser, 2003: The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. *Science*, **301**, 1898-1903.

Kirkpatrick, C. J., A. Alves, H. Köhler, J. Kriegsmann, F. Bittinger, M. Otto, D. F. Williams und R. Eloy, 2000: Biomaterial-induced sarcoma: a novel model to study preneoplastic change. *The American journal of pathology*, **156**, 1455-1467.

Kirpensteijn, J., M. Kik, G. Rutteman und E. Teske, 2002a: Prognostic significance of a new histologic grading system for canine osteosarcoma. *Veterinary pathology*, **39**, 240-246.

Kirpensteijn, J., M. Kik, E. Teske und G. R. Rutteman, 2008: TP53 gene mutations in canine osteosarcoma. *Veterinary Surgery*, **37**, 454-460.

Kirpensteijn, J., D. Steinheimer, R. Park, B. Powers, R. Straw, N. Endenburg und S. Withrow, 1998: Comparison of cemented and non-cemented allografts in dogs with osteosarcoma. *VCOT Archive*, **11**, 20-26.

Kirpensteijn, J., E. Teske, M. Kik, T. Klenner und G. Rutteman, 2002b: Lobaplatin as an adjuvant chemotherapy to surgery in canine appendicular osteosarcoma: a phase II evaluation. *Anticancer research*, **22**, 2765-2770.

Kirpensteijn, J., R. VAN und N. E. Bos, 1999: Adaptation of dogs to the amputation of limb and their owners' satisfaction with the. *Veterinary Record*, **144**, 115-118.

Kirpenstein, J., R. C. Straw, A. D. Pardo, W. H. Adams, S. J. Withrow und C. S. Calhoon, 1994: Partial and total scapulectomy in the dog. *American Animal Hospital Association (USA)*.

Kistler, K., 1981: Canine osteosarcoma: 1462 cases reviewed to uncover patterns of height, weight, breed, sex, age and site of involvement. *Phi Zeta Awards, University of Pennsylvania, School of Veterinary Medicine*, **198**.

Kleinerman, E. S., 2014: *Current advances in osteosarcoma*. Springer.

Kleinerman, E. S., J. B. Gano, D. A. Johnston, R. S. Benjamin und N. Jaffe, 1995: Efficacy of liposomal muramyl tripeptide (CGP 19835A) in the treatment of relapsed osteosarcoma. *American journal of clinical oncology*, **18**, 93-99.

Kleinerman, E. S., S.-F. Jia, J. Griffin, N. L. Seibel, R. S. Benjamin und N. Jaffe, 1992: Phase II study of liposomal muramyl tripeptide in osteosarcoma: the cytokine cascade and monocyte activation following administration. *Journal of Clinical Oncology*, **10**, 1310-1316.

Knecht, C. D. und W. A. Priester, 1978: Musculoskeletal tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, **172**, 72-74.

Knobloch, S., 1990: *Komplikationen nach Osteosynthese von Schaftfrakturen langer Röhrenknochen bei Hund und Katze: Ursachen, Therapie und Ergebnisse in den Jahren 1980-1987*. na.

Knottenbelt, C., G. Chambers, E. Gault und D. Argyle, 2006: The in vitro effects of piroxicam and meloxicam on canine cell lines. *Journal of small animal practice*, **47**, 14-20.

Koshkina, N. V. und E. S. Kleinerman, 2005: Aerosol gemcitabine inhibits the growth of primary osteosarcoma and osteosarcoma lung metastases. *International journal of cancer*, **116**, 458-463.

KOSOVSKY, J. K., D. T. MATTHIESEN, S. MARRETTA und A. K. PATNAIK, 1991: Results of partial mandibulectomy for the treatment of oral tumors in 142 dogs. *Veterinary Surgery*, **20**, 397-401.

Kotz, R., M. Dominkus, T. Zettl, P. Ritschl, R. Windhager, H. Gadner, C. Zielinski und M. Salzer-Kuntschik, 2002: Advances in bone tumour treatment in 30 years with respect to survival and limb salvage. A single institution experience. *International orthopaedics*, **26**, 197-202.

- Kraegel, S., B. Madewell, E. Simonson und C. Gregory, 1991: Osteogenic sarcoma and cisplatin chemotherapy in dogs: 16 cases (1986-1989). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **199**, 1057-1059.
- Kramer, A., P. J. Walsh und B. Seguin, 2008: Hemipelvectomy in dogs and cats: technique overview, variations, and description. *Veterinary surgery*, **37**, 413-419.
- Kuang, Y., X. Du, J. Zhou und B. Xu, 2014a: Supramolecular nanofibrils inhibit cancer progression in vitro and in vivo. *Advanced healthcare materials*, **3**, 1217-1221.
- Kuang, Y., J. Shi, J. Li, D. Yuan, K. A. Alberti, Q. Xu und B. Xu, 2014b: Pericellular hydrogel/nanonets inhibit cancer cells. *Angewandte Chemie International Edition*, **53**, 8104-8107.
- Kumar, P., Tumor hypoxia and anemia: impact on the efficacy of radiation therapy. in *Proceedings of the Seminars in hematology*, 2000, p. 4-8.
- Kuntz, C., W. Dernell, B. Powers und S. Withrow, 1998a: Extraskelatal osteosarcomas in dogs: 14 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **34**, 26-30.
- KUNTZ, C. A., T. L. ASSELIN, W. S. DERNELL, B. E. POWERS, R. C. STRAW und S. J. WITHROW, 1998b: Limb salvage surgery for osteosarcoma of the proximal humerus: outcome in 17 dogs. *Veterinary Surgery*, **27**, 417-422.
- Kustritz, M. V. R., 2007: Determining the optimal age for gonadectomy of dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **231**, 1665-1675.
- Kustritz, R., 2012: Effects of surgical sterilization on canine and feline health and on society. *Reproduction in domestic animals*, **47**, 214-222.
- Laboratory, T. J., 2017: C57BL/6J The Jackson Laboratory.
- Lana, S. E., G. K. Ogilvie, R. A. Hansen, B. E. Powers, W. S. Dernell und S. J. Withrow, 2000: Identification of matrix metalloproteinases in canine neoplastic tissue. *American journal of veterinary research*, **61**, 111-114.

Langenbach, A., M. Anderson, D. Dambach, K. Sorenmo und F. Shofer, 1998: Extraskelletal osteosarcomas in dogs: a retrospective study of 169 cases (1986-1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*, **34**, 113-120.

Langova, V., R. Straw, A. Mutsaers und D. Thamm, 2004: Treatment of canine osteosarcoma with surgery, carboplatin, doxorubicin and piroxicam. *Australian Veterinary Practitioner*, **34**, 98-102.

Lansdowne, J. L., E. Monnet, D. C. Twedt und W. S. Dernell, 2005: Thoracoscopic lung lobectomy for treatment of lung tumors in dogs. *Veterinary surgery*, **34**, 530-535.

Lardner, A., 2001: The effects of extracellular pH on immune function. *Journal of leukocyte biology*, **69**, 522-530.

Lascelles, B. D. X., W. S. Dernell, M. T. Correa, M. Lafferty, C. M. Devitt, C. A. Kuntz, R. C. Straw und S. J. Withrow, 2005: Improved survival associated with postoperative wound infection in dogs treated with limb-salvage surgery for osteosarcoma. *Annals of Surgical Oncology*, **12**, 1073-1083.

Lascelles, B. D. X., M. J. Thomson, W. S. Dernell, R. C. Straw, M. Lafferty und S. J. Withrow, 2003: Combined dorsolateral and intraoral approach for the resection of tumors of the maxilla in the dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **39**, 294-305.

Leeper, H., A. Viall, C. Ruaux und S. Bracha, 2017: Preliminary evaluation of serum total cholesterol concentrations in dogs with osteosarcoma. *Journal of Small Animal Practice*.

Leibman, N. F., C. A. Kuntz, P. F. Steyn, M. J. Fettman, B. E. Powers, S. J. Withrow und W. S. Dernell, 2001: Accuracy of radiography, nuclear scintigraphy, and histopathology for determining the proximal extent of distal radius osteosarcoma in dogs. *Veterinary Surgery*, **30**, 240-245.

Lemarie, E., L. Vecellio, J. Hureaux, C. Prunier, C. Valat, D. Grimbert, M. Boidron-Celle, B. Giraudeau, A. le Pape und E. Pichon, 2011: Aerosolized gemcitabine in patients with carcinoma of the lung: feasibility and safety study. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery*, **24**, 261-270.

Levine, R., T. Forest und C. Smith, 2002: Tumor suppressor PTEN is mutated in canine osteosarcoma cell lines and tumors. *Veterinary pathology*, **39**, 372-378.

Li, J., Y. Kuang, J. Shi, J. Zhou, J. E. Medina, R. Zhou, D. Yuan, C. Yang, H. Wang und Z. Yang, 2015: Enzyme-Instructed Intracellular Molecular Self-Assembly to Boost Activity of Cisplatin against Drug-Resistant Ovarian Cancer Cells. *Angewandte Chemie International Edition*, **54**, 13307-13311.

Link, M. P., A. M. Goorin, A. W. Miser, A. A. Green, C. B. Pratt, J. B. Belasco, J. Pritchard, J. S. Malpas, A. R. Baker und J. A. Kirkpatrick, 1986: The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity. *New England Journal of Medicine*, **314**, 1600-1606.

Liptak, J. M., W. S. Dernell, N. Ehrhart, M. H. Lafferty, G. J. Monteith und S. J. Withrow, 2006: Cortical allograft and endoprosthesis for limb-sparing surgery in dogs with distal radial osteosarcoma: A prospective clinical comparison of two different limb-sparing techniques. *Veterinary Surgery*, **35**, 518-533.

Liptak, J. M., W. S. Dernell, S. A. Rizzo, G. J. Monteith, D. A. Kamstock und S. J. Withrow, 2008: Reconstruction of chest wall defects after rib tumor resection: a comparison of autogenous, prosthetic, and composite techniques in 44 dogs. *Veterinary surgery*, **37**, 479-487.

Liptak, J. M., W. S. Dernell, R. C. Straw, V. J. Jameson, M. H. Lafferty, S. A. Rizzo und S. J. Withrow, 2004a: Intercalary Bone Grafts for Joint and Limb Preservation in 17 Dogs with High-Grade Malignant Tumors of the Diaphysis. *Veterinary surgery*, **33**, 457-467.

Liptak, J. M., F. MVetClinStud, W. S. Dernell, N. Ehrhart und S. J. Withrow, 2004b: Canine appendicular osteosarcoma: diagnosis and palliative treatment. *Comp Cont Educ Pract*.

Liptak, J. M., G. E. Pluhar, W. S. Dernell und S. J. Withrow, 2005: Limb-Sparing Surgery in a Dog with Osteosarcoma of the Proximal Femur. *Veterinary surgery*, **34**, 71-77.

Loukopoulos, P., T. O'brien, M. Ghoddusi, B. Mungall und W. Robinson, 2004: Characterisation of three novel canine osteosarcoma cell lines producing high levels of matrix metalloproteinases. *Research in veterinary science*, **77**, 131-141.

Loukopoulos, P. und W. Robinson, 2007: Clinicopathological relevance of tumour grading in canine osteosarcoma. *Journal of comparative Pathology*, **136**, 65-73.

- Loukopoulos, P., J. Thornton und W. Robinson, 2003: Clinical and pathologic relevance of p53 index in canine osseous tumors. *Veterinary pathology*, **40**, 237-248.
- Lu, C., N. Saless, X. Wang, A. Sinha, S. Decker, G. Kazakia, H. Hou, B. Williams, H. M. Swartz, T. K. Hunt, T. Miclau und R. S. Marcucio, 2013: The role of oxygen during fracture healing. *Bone*, **52**, 220-229.
- Lucas, P., T. Fan, L. Garrett, D. Griffon und J. Wypij, 2008: A Comparison of Five Different Bone Resorption Markers in Osteosarcoma-Bearing Dogs, Normal Dogs, and Dogs with Orthopedic Diseases. *Journal of veterinary internal medicine*, **22**, 1008-1013.
- Lund, E. M., P. J. Armstrong, C. A. Kirk und J. S. Klausner, 2006: Prevalence and risk factors for obesity in adult dogs from private US veterinary practices. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, **4**, 177.
- Ma, H., C. He, Y. Cheng, Z. Yang, J. Zang, J. Liu und X. Chen, 2015: Localized Co-delivery of Doxorubicin, Cisplatin, and Methotrexate by Thermosensitive Hydrogels for Enhanced Osteosarcoma Treatment. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **7**, 27040-27048.
- MacDonald, T. L. und T. D. Schiller, 2010: Limb-sparing surgery using tantalum metal endoprosthesis in a dog with osteosarcoma of the distal radius. *The Canadian Veterinary Journal*, **51**, 497.
- MacEwen, E. G. und I. D. Kurzman, 1996: Canine osteosarcoma: amputation and chemioimmunotherapy. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **26**, 123-133.
- MacEwen, E. G., I. D. Kurzman, R. C. Rosenthal, B. W. Smith, P. A. Manley, J. K. Roush und P. E. Howard, 1989: Therapy for osteosarcoma in dogs with intravenous injection of liposome-encapsulated muramyl tripeptide. Oxford University Press.
- MacEwen, E. G., J. Pastor, J. Kutzke, R. Tsan, I. D. Kurzman, D. H. Thamm, M. Wilson und R. Radinsky, 2004: IGF-1 receptor contributes to the malignant phenotype in human and canine osteosarcoma. *Journal of cellular biochemistry*, **92**, 77-91.
- Maes, C., G. Carmeliet und E. Schipani, 2012: Hypoxia-driven pathways in bone development, regeneration and disease. *Nat Rev Rheumatol*, **8**, 358-366.

Maier, G., 1975: „Aromatisch“ □–was heißt das eigentlich? *Chemie in unserer Zeit*, **9**, 131-141.

Mansour, J. M., 2003: Biomechanics of cartilage. *Kinesiology: the mechanics and pathomechanics of human movement*, 66-79.

Marcellin-Little, D. J., D. J. DeYoung, D. E. Thrall und C. L. Merrill, 1999: Osteosarcoma at the site of bone infarction associated with total hip arthroplasty in a dog. *Veterinary Surgery*, **28**, 54-60.

Martin, T., P. Ingleton, J. Underwood, V. Michelangeli, N. Hunt und R. Melick, 1976: Parathyroid hormone-responsive adenylate cyclase in induced transplantable osteogenic rat sarcoma. *Nature*, **260**, 436-438.

Matthiesen, D. T., G. N. Clark, R. J. Orsher, A. O. Pardo, J. Glennon und A. K. Patnaik, 1992: En bloc resection of primary rib tumors in 40 dogs. *Veterinary Surgery*, **21**, 201-204.

Mauldin, G. N., R. E. Matus, S. J. Withrow und A. K. Patnaik, 1988: Canine osteosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **2**, 177-180.

Maxwell, P. H., M. S. Wiesener, G.-W. Chang, S. C. Clifford, E. C. Vaux, M. E. Cockman, C. C. Wykoff, C. W. Pugh, E. R. Maher und P. J. Ratcliffe, 1999: The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, **399**, 271-275.

McEntee, M. C., 1997: Radiation therapy in the management of bone tumors. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, **27**, 131-138.

McGreevy, P., P. Thomson, C. Pride, A. Fawcett, T. Grassi und B. Jones, 2005: Prevalence of obesity in dogs examined by Australian veterinary practices and the risk factors involved. *Veterinary Record-English Edition*, **156**, 695-701.

Mehl, M., B. Seguin, W. Dernell, M. Lafferty, P. Kass und S. Withrow, 2005: Survival analysis of one versus two treatments of local delivery cisplatin in a biodegradable polymer for canine osteosarcoma. *Veterinary and comparative oncology*, **3**, 81-86.

Mendoza, S., T. Konishi, W. Dernell, S. Withrow und C. Miller, 1998: Status of the p53, Rb and MDM2 genes in canine osteosarcoma. *Anticancer research*, **18**, 4449-4453.

Messerschmitt, P. J., R. M. Garcia, F. W. Abdul-Karim, E. M. Greenfield und P. J. Getty, 2009: Osteosarcoma. *JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, **17**, 515-527.

Meyers, P. A., C. L. Schwartz, M. D. Krailo, J. H. Healey, M. L. Bernstein, D. Betcher, W. S. Ferguson, M. C. Gebhardt, A. M. Goorin und M. Harris, 2008: Osteosarcoma: the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival—a report from the Children's Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*, **26**, 633-638.

MIAMED, 2018: Bösartige Knochentumoren. Amboss.

Minchinton, A. I. und I. F. Tannock, 2006: Drug penetration in solid tumours. *Nature Reviews Cancer*, **6**, 583-592.

Mirabello, L., R. Pfeiffer, G. Murphy, N. C. Daw, A. Patiño-Garcia, R. J. Troisi, R. N. Hoover, C. Douglass, J. Schüz und A. W. Craft, 2011: Height at diagnosis and birth-weight as risk factors for osteosarcoma. *Cancer Causes & Control*, **22**, 899.

Mirabello, L., R. J. Troisi und S. A. Savage, 2009: Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004. *Cancer*, **115**, 1531-1543.

Misdorp, W. und A. Hart, 1979: Some prognostic and epidemiologic factors in canine osteosarcoma. *Journal of the National Cancer Institute*, **62**, 537-545.

Molls, M., P. Stadler, A. Becker, H. Feldmann und J. Dunst, 1998a: Relevance of oxygen in radiation oncology. Mechanisms of action, correlation to low hemoglobin levels. *Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Röntgengesellschaft...[et al]*, **174**, 13-16.

Molls, M., P. Vaupel und J. M. Brown, 1998b: *Blood perfusion and microenvironment of human tumors: implications for clinical radiooncology*. Springer Verlag.

Moore, A. S., W. S. Dernell, G. K. Ogilvie, O. Kristal, R. Elmslie, B. Kitchell, S. Susaneck, R. Rosenthal, M. K. Klein und J. Obradovich, 2007: Doxorubicin and BAY 12–9566 for the Treatment of Osteosarcoma in Dogs: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Journal of veterinary internal medicine*, **21**, 783-790.

Morello, E., P. Buracco, M. Martano, B. Peirone, C. Capurro, A. Valazza, D. Corro, R. Ferracini und M. Sora, 2001: Bone allografts and adjuvant cisplatin for the treatment of canine appendicular osteosarcoma in 18 dogs. *Journal of Small Animal Practice*, **42**, 61-66.

Morello, E., M. Martano und P. Buracco, 2011: Biology, diagnosis and treatment of canine appendicular osteosarcoma: similarities and differences with human osteosarcoma. *The Veterinary Journal*, **189**, 268-277.

Morello, E., E. Vasconi, M. Martano, B. Peirone und P. Buracco, 2003: Pasteurized tumoral autograft and adjuvant chemotherapy for the treatment of canine distal radial osteosarcoma: 13 cases. *Veterinary surgery*, **32**, 539-544.

Morgan, J. P., N. Ackerman, C. S. Bailey und R. R. Pool, 1980: Vertebral tumors in the dog: a clinical radiologic, and pathologic study of 61 primary and secondary lesions. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, **21**, 197-212.

Mosmann, T., 1983: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, **65**, 55-63.

Mu, X., R. Agarwal, D. March, A. Rothenberg, C. Voigt, J. Tebbets, J. Huard und K. Weiss, 2016: Notch Signaling Mediates Skeletal Muscle Atrophy in Cancer Cachexia Caused by Osteosarcoma. *Sarcoma*, **2016**.

Mueller, F., B. Fuchs und B. Kaser-Hotz, 2007: Comparative biology of human and canine osteosarcoma. *Anticancer Research*, **27**, 155-164.

Mueller, F., V. Poirier, K. Melzer, D. Nitzl, M. Roos und B. Kaser-Hotz, 2005: Palliative radiotherapy with electrons of appendicular osteosarcoma in 54 dogs. *in vivo*, **19**, 713-716.

Mullins, M. N., S. E. Lana, W. S. Dernell, G. K. Ogilvie, S. J. Withrow und E. Ehrhart, 2004: Cyclooxygenase-2 expression in canine appendicular osteosarcomas. *Journal of veterinary internal medicine*, **18**, 859-865.

Murphy, S. und R. Parker, 1997: Osteosarcoma following total hip arthroplasty in a dog. *Journal of small animal practice*, **38**, 263-267.

- Nelson, A. R., B. Fingleton, M. L. Rothenberg und L. M. Matrisian, 2000: Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *Journal of clinical oncology*, **18**, 1135-1135.
- Nolte, I., M. Nolte und D. von Bomhard, 2001: *Praxis der Onkologie bei Hund und Katze*. Enke.
- Norton, C., C. Drenen und S. Emms, 2006: Subtotal scapulectomy as the treatment for scapular tumour in the dog: a report of six cases. *Australian veterinary journal*, **84**, 364-366.
- O'Brien, M., R. Straw, S. Withrow, B. Powers, V. Jameson, M. Lafferty, G. Ogilvie und S. LaRue, 1993: Resection of pulmonary metastases in canine osteosarcoma: 36 cases (1983–1992). *Veterinary Surgery*, **22**, 105-109.
- Oblak, M. L., S. E. Boston, G. Higginson, S. G. Patten, G. J. Monteith und J. P. Woods, 2012: The impact of pamidronate and chemotherapy on survival times in dogs with appendicular primary bone tumors treated with palliative radiation therapy. *Veterinary Surgery*, **41**, 430-435.
- O'Brien, M. W., SJ; Straw, RC, 1993: Recent advances in the treatment of canine appendicular osteosarcoma. *Comp Contin Educ Pract Vet.* , **15**, 613–616.
- Oehler, C., 2014: Die klinische Bedeutung der Tumorphypoxie. *MEDIZIN FORUM info@onkologie*.
- Ogilvie, G., R. Straw, V. Jameson, L. Walters, M. Lafferty, B. Powers und S. Withrow, 1993: Evaluation of single-agent chemotherapy for treatment of clinically evident osteosarcoma metastases in dogs: 45 cases (1987-1991). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **202**, 304-306.
- Ohta, S., D. Glancy und W. C. Chan, 2016: DNA-controlled dynamic colloidal nanoparticle systems for mediating cellular interaction. *Science*, **351**, 841-845.
- Okunieff, P., J. De Bie, E. Dunphy und D. J. Terris, 1996: Oxygen distributions partly explain the radiation response of human squamous cell carcinomas. *The British journal of cancer. Supplement*, **27**, S185.
- Ottaviani, G. und N. Jaffe, 2009: The epidemiology of osteosarcoma. *Pediatric and adolescent osteosarcoma*. Springer.

Pan, Q., C. G. Kleer, K. L. Van Golen, J. Irani, K. M. Bottema, C. Bias, M. De Carvalho, E. A. Mesri, D. M. Robins und R. D. Dick, 2002: Copper deficiency induced by tetrathiomolybdate suppresses tumor growth and angiogenesis. *Cancer research*, **62**, 4854-4859.

Pang, L. Y., E. L. Gatenby, A. Kamida, B. A. Whitelaw, T. R. Hupp und D. J. Argyle, 2014: Global gene expression analysis of canine osteosarcoma stem cells reveals a novel role for COX-2 in tumour initiation. *PLoS One*, **9**, e83144.

Paoloni, M., S. Davis, S. Lana, S. Withrow, L. Sangiorgi, P. Picci, S. Hewitt, T. Triche, P. Meltzer und C. Khanna, 2009: Canine tumor cross-species genomics uncovers targets linked to osteosarcoma progression. *BMC genomics*, **10**, 625.

Park, S. I., S. J. Kim, L. K. McCauley und G. E. Gallick, 2010: Preclinical mouse models of human prostate cancer and their utility in drug discovery. *Current Protocols in Pharmacology*, 14.15. 11-14.15. 27.

Parke, A., P. Bhattacharjee, R. Palmer und N. R. Lazarus, 1988: Characterization and quantification of copper sulfate-induced vascularization of the rabbit cornea. *The American journal of pathology*, **130**, 173.

Pashkuleva, I. und R. L. Reis, 2010: Sugars: burden or biomaterials of the future? *Journal of Materials Chemistry*, **20**, 8803-8818.

Patnaik, A., 1990: Canine extraskeletal osteosarcoma and chondrosarcoma: a clinicopathologic study of 14 cases. *Veterinary pathology*, **27**, 46-55.

PAUTKE, C., M. SCHIEKER, T. TISCHER, A. KOLK, P. NETH, W. MUTSCHLER und S. MILZ, 2004: Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer research*, **24**, 3743-3748.

Peter, C., L. Handt und S. Smith, 1998: Esophageal irritation due to alendronate sodium tablets (possible mechanisms). *Digestive diseases and sciences*, **43**, 1998-2002.

Phillips, B., B. E. Powers, W. S. Dernell, R. C. Straw, C. Khanna, G. S. Hogge und D. M. Vail, 2009: Use of single-agent carboplatin as adjuvant or neoadjuvant therapy in conjunction with

amputation for appendicular osteosarcoma in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **45**, 33-38.

Phillips, J. C., L. Lembcke und T. Chamberlin, 2010: A novel locus for canine osteosarcoma (OSA1) maps to CFA34, the canine orthologue of human 3q26. *Genomics*, **96**, 220-227.

Phillips, J. C., B. Stephenson, M. Hauck und J. Dillberger, 2007: Heritability and segregation analysis of osteosarcoma in the Scottish deerhound. *Genomics*, **90**, 354-363.

Phillips, L., D. Hager, R. Parker und D. Yanik, 1986: OSTEOSARCOMA WITH A PATHOLOGIC FRACTURE IN A SIX-MONTH-OLD DOG. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, **27**, 18-19.

Pires, R. A., Y. M. Abul-Haija, D. S. Costa, R. Novoa-Carballal, R. L. Reis, R. V. Ulijn und I. Pashkuleva, 2015: Controlling cancer cell fate using localized biocatalytic self-assembly of an aromatic carbohydrate amphiphile. *Journal of the American Chemical Society*, **137**, 576-579.

Pirkey-Ehrhart, N., S. J. Withrow, R. C. Straw, E. J. Ehrhart, R. L. Page, H. L. Hottinger, K. A. Hahn, W. B. Morrison, M. R. Albrecht und C. S. Hedlund, 1995: Primary rib tumors in 54 dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **31**, 65-69.

Poirier, V., M. Huelsmeyer, I. Kurzman, D. Thamm und D. Vail, 2003: The bisphosphonates alendronate and zoledronate are inhibitors of canine and human osteosarcoma cell growth in vitro. *Veterinary and comparative oncology*, **1**, 207-215.

Pollard, T. D. und J. A. Cooper, 2009: Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*, **326**, 1208-1212.

Powers, B., S. LaRue, S. Withrow, R. Straw und S. Richter, 1988: Jamshidi needle biopsy for diagnosis of bone lesions in small animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **193**, 205-210.

Powers, B. E., S. J. Withrow, D. E. Thrall, R. C. Straw, S. M. Larue, R. L. Page und E. L. Gillette, 1991: Percent tumor necrosis as a predictor of treatment response in canine osteosarcoma. *Cancer*, **67**, 126-134.

Priester, W. A. und F. W. McKay, 1980: The occurrence of tumors in domestic animals. *Natl Cancer Inst Monogr*, 1-210.

Psychas, V., P. Loukopoulos, Z. S. Polizopoulou und G. Sofianidis, 2009: Multilobular tumour of the caudal cranium causing severe cerebral and cerebellar compression in a dog. *Journal of veterinary science*, **10**, 81-83.

Quan, G. M. und P. F. Choong, 2006: Anti-angiogenic therapy for osteosarcoma. *Cancer and Metastasis Reviews*, **25**, 707-713.

Rainusso, N., L. L. Wang und J. T. Yustein, 2013: The adolescent and young adult with cancer: state of the art-bone tumors. *Current oncology reports*, **15**, 296-307.

Raju, K. S., G. Alessandri, M. Ziche und P. M. Gullino, 1982: Ceruloplasmin, Copper Ions, and Angiogenesis 2. *Journal of the National Cancer Institute*, **69**, 1183-1188.

Ramirez, O., R. K. Dodge, R. L. Page, G. S. Price, M. L. Hauck, T. A. Ladue, F. Nutter und D. E. Thrall, 1999: Palliative radiotherapy of appendicular osteosarcoma in 95 dogs. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, **40**, 517-522.

Rankin, K. S., M. Starkey, J. Lunec, C. H. Gerrand, S. Murphy und S. Biswas, 2012: Of dogs and men: comparative biology as a tool for the discovery of novel biomarkers and drug development targets in osteosarcoma. *Pediatric blood & cancer*, **58**, 327-333.

Reynolds, T. Y., S. Rockwell und P. M. Glazer, 1996: Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer research*, **56**, 5754-5757.

Robert, H. W., 2000: Malignant versus nonmalignant bone disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **30**, 315-347.

Rodriguez Jr, C. O., T. A. Crabbs, D. W. Wilson, V. A. Cannan, K. A. Skorupski, N. Gordon, N. Koshkina, E. Kleinerman und P. M. Anderson, 2010: Aerosol gemcitabine: preclinical safety and in vivo antitumor activity in osteosarcoma-bearing dogs. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery*, **23**, 197-206.

- Rosemann, M., V. Kuosaite, M. Nathrath und M. J. Atkinson, 2002: The genetics of radiation-induced and sporadic osteosarcoma: a unifying theory? *Journal of radiological protection*, **22**, A113.
- Rosenberger, J. A., N. V. Pablo und P. C. Crawford, 2007: Prevalence of and intrinsic risk factors for appendicular osteosarcoma in dogs: 179 cases (1996–2005). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **231**, 1076-1080.
- Rowell, J. L., D. O. McCarthy und C. E. Alvarez, 2011: Dog models of naturally occurring cancer. *Trends in molecular medicine*, **17**, 380-388.
- Rozhin, J., M. Sameni, G. Ziegler und B. F. Sloane, 1994: Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer research*, **54**, 6517-6525.
- Ru, G., B. Terracini und L. Glickman, 1998: Host related risk factors for canine osteosarcoma. *The Veterinary Journal*, **156**, 31-39.
- Saam, D. E., J. M. Liptak, M. J. Stalker und R. Chun, 2011: Predictors of outcome in dogs treated with adjuvant carboplatin for appendicular osteosarcoma: 65 cases (1996–2006). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **238**, 195-206.
- Sabile, A. A., M. J. Arlt, R. Muff, B. Bode, B. Langsam, J. Bertz, T. Jentzsch, G. J. Puskas, W. Born und B. Fuchs, 2012: Cyr61 expression in osteosarcoma indicates poor prognosis and promotes intratibial growth and lung metastasis in mice. *J Bone Miner Res*, **27**, 58-67.
- Sabin, F. R., C. Doan und C. Forkner, 1932: The production of osteogenic sarcomata and the effects on lymph nodes and bone marrow of intravenous injections of radium chloride and mesothorium in rabbits. *Journal of Experimental Medicine*, **56**, 267-289.
- Sacornrattana, O., N. Dervisis und E. McNiel, 2013: Abdominal ultrasonographic findings at diagnosis of osteosarcoma in dogs and association with treatment outcome. *Veterinary and comparative oncology*, **11**, 199-207.
- Sagartz, J., W. Bodley, R. Gamblin, C. Couto, L. Tierney und C. Capen, 1996: p53 tumor suppressor protein overexpression in osteogenic tumors of dogs. *Veterinary pathology*, **33**, 213-221.

- Salah, S. und S. Toubasi, 2015: Factors predicting survival following complete surgical remission of pulmonary metastasis in osteosarcoma. *Molecular and clinical oncology*, **3**, 157-162.
- Salisbury, S. und G. Lantz, 1988: Long-term results of partial mandibulectomy for treatment of oral tumors in 30 dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **24**, 285-294.
- Sampson, V. B., R. Gorlick, D. Kamara und E. A. Kolb, 2013a: A review of targeted therapies evaluated by the pediatric preclinical testing program for osteosarcoma. *Frontiers in oncology*, **3**.
- Sampson, V. B., D. F. Kamara und E. A. Kolb, 2013b: Xenograft and genetically engineered mouse model systems of osteosarcoma and Ewing's sarcoma: tumor models for cancer drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, **8**, 1181-1189.
- Sandberg, A. A. und J. A. Bridge, 2003: Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. *Cancer Genet Cytogenet*, **145**, 1-30.
- Schlegel, M. S., 2017: Einfluss von pathologischen Frakturen auf die Prognose von primär malignen Knochentumoren. Dissertation, München, Technische Universität München, 2017.
- Schmidt, A., M. Nielen, O. Klungel, A. Hoes, A. de Boer, R. Groenwold, J. Kirpensteijn und V. Investigators, 2013: Prognostic factors of early metastasis and mortality in dogs with appendicular osteosarcoma after receiving surgery: an individual patient data meta-analysis. *Preventive veterinary medicine*, **112**, 414-422.
- Schmidt, J., G. P. Strauß, A. Schön, A. Luz, A. B. Murray, A. Melchiori, O. Aresu und V. Erfle, 1988: Establishment and characterization of osteogenic cell lines from a spontaneous murine osteosarcoma. *Differentiation*, **39**, 151-160.
- Schumann, G., R. Klauke, F. Canalias, S. Bossert-Reuther, P. F. Franck, F. J. Gella, P. J. Jorgensen, D. Kang, J. M. Lessinger, M. Panteghini und F. Ceriotti, 2011: IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. Part 9: reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) Scientific Division, Committee on Reference Systems of Enzymes (C-RSE) (1)). *Clin Chem Lab Med*, **49**, 1439-1446.

Scott, M. C., A. L. Sarver, K. J. Gavin, V. Thayanithy, D. M. Getzy, R. A. Newman, G. R. Cutter, K. Lindblad-Toh, W. C. Kisseberth und L. E. Hunter, 2011: Molecular subtypes of osteosarcoma identified by reducing tumor heterogeneity through an interspecies comparative approach. *Bone*, **49**, 356-367.

Seeliger, C., M. Culmes, L. Schyschka, X. Yan, G. Damm, Z. Wang, J. Kleeff, W. E. Thasler, J. Hengstler, U. Stöckle, S. Ehnert und A. K. Nüssler, 2013: Decrease of Global Methylation Improves Significantly Hepatic Differentiation of Ad-MSCs: Possible Future Application for Urea Detoxification. *Cell Transplantation*, **22**, 119-131.

Séguin, B., P. J. Walsh, D. R. Mason, E. R. Wisner, J. L. Parmenter und W. S. Dernell, 2003: Use of An ipsilateral Vascularized Ulnar Transposition Autograft for Limb-Sparing Surgery of the Distal Radius in Dogs: An Anatomic and Clinical Study. *Veterinary Surgery*, **32**, 69-79.

Selmic, L., J. Burton, D. Thamm, S. Withrow und S. Lana, 2014: Comparison of carboplatin and doxorubicin-based chemotherapy protocols in 470 dogs after amputation for treatment of appendicular osteosarcoma. *Journal of veterinary internal medicine*, **28**, 554-563.

Selvarajah, G. T. und J. Kirpensteijn, 2010: Prognostic and predictive biomarkers of canine osteosarcoma. *The Veterinary Journal*, **185**, 28-35.

Semenza, G. L., 2003: Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews cancer*, **3**, 721-732.

Semenza, G. L. und G. L. Wang, 1992: A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular and cellular biology*, **12**, 5447-5454.

Shapiro, W., T. Fossum, B. Kitchell, C. Couto und G. Theilen, 1988: Use of cisplatin for treatment of appendicular osteosarcoma in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **192**, 507-511.

Shi, F., E. G. MacEwen und I. D. Kurzman, 1993: In vitro and in vivo effect of doxorubicin combined with liposome-encapsulated muramyl tripeptide on canine monocyte activation. *Cancer research*, **53**, 3986-3991.

- Shi, H., W. D. Mu, B. Zhang, T. Meng, S. T. Zhang und D. S. Zhou, 2016: Potential role of S-adenosylmethionine in osteosarcoma development. *Onco Targets Ther*, **9**, 3653-3659.
- Siegel, J. S., 1996: Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives. *Science*, **271**, 949-950.
- Sim, F., J. Edmonson und L. Wold, 1993: Soft-tissue sarcomas. Future perspectives. *Clinical orthopaedics and related research*, 106-112.
- Simcock, J. O., S. S. Withers, C. Y. Prpich, C. A. Kuntz und B. E. Rutland, 2012: Evaluation of a single subcutaneous infusion of carboplatin as adjuvant chemotherapy for dogs with osteosarcoma: 17 cases (2006–2010). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **241**, 608-614.
- Sindhvani, S., A. M. Syed, S. Wilhelm, D. R. Glancy, Y. Y. Chen, M. Dobosz und W. C. Chan, 2016: Three-dimensional optical mapping of nanoparticle distribution in intact tissues. *ACS nano*, **10**, 5468-5478.
- Singer, V. L., L. J. Jones, S. T. Yue und R. P. Haugland, 1997: Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Analytical biochemistry*, **249**, 228-238.
- Skorupski, K. A., J. Uhl, A. Szivek, S. Allstadt Frazier, R. B. Rebhun und C. O. Rodriguez, 2016: Carboplatin versus alternating carboplatin and doxorubicin for the adjuvant treatment of canine appendicular osteosarcoma: a randomized, phase III trial. *Veterinary and comparative oncology*, **14**, 81-87.
- Slatter, D. H., 2003: *Textbook of small animal surgery*. Elsevier health sciences.
- Sloane, B. F., K. Moin, E. Krepela und J. Rozhin, 1990: Cathepsin B and its endogenous inhibitors: the role in tumor malignancy. *Cancer and Metastasis Reviews*, **9**, 333-352.
- Smith, A. N., 2014: The role of neutering in cancer development. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **44**, 965-975.

Sottnik, J., S. Rao, M. Lafferty, D. Thamm, P. Morley, S. Withrow und S. Dow, 2010a: Association of blood monocyte and lymphocyte count and disease-free interval in dogs with osteosarcoma. *Journal of veterinary internal medicine*, **24**, 1439-1444.

Sottnik, J. L., L. W. U'Ren, D. H. Thamm, S. J. Withrow und S. W. Dow, 2010b: Chronic bacterial osteomyelitis suppression of tumor growth requires innate immune responses. *Cancer immunology, immunotherapy*, **59**, 367-378.

Spencer, J. A., F. Ferraro, E. Roussakis, A. Klein, J. Wu, J. M. Runnels, W. Zaher, L. J. Mortensen, C. Alt und R. Turcotte, 2014: Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature*, **508**, 269.

Spodnick, G., J. Berg, W. Rand, S. Schelling, G. Couto, H. Harvey, R. Henderson, G. MacEwen, N. Mauldin und D. McCaw, 1992: Prognosis for dogs with appendicular osteosarcoma treated by amputation alone: 162 cases (1978-1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **200**, 995-999.

Spugnini, E., B. Vincenzi, G. Caruso, A. Baldi, G. Citro, D. Santini und G. Tonini, 2009: Zoledronic acid for the treatment of appendicular osteosarcoma in a dog. *Journal of Small Animal Practice*, **50**, 44-46.

Steinbrech, D. S., B. J. Mehrara, P. B. Saadeh, G. Chin, M. E. Dudziak, R. P. Gerrets, G. K. Gittes und M. T. Longaker, 1999: Hypoxia regulates VEGF expression and cellular proliferation by osteoblasts in vitro. *Plastic and reconstructive surgery*, **104**, 738-747.

Stevenson, S., 1991: Fracture-associated sarcomas. *Veterinary Clinics of North America: small animal practice*, **21**, 859-872.

Stevenson, S., R. Hohn, O. Pohler, A. Fetter, M. Olmstead und A. Wind, 1982: Fracture-associated sarcoma in the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **180**, 1189-1196.

Stockhaus, C., H. Schoon, S. Scharvogel und E. Teske, 2003: Die Bedeutung der Zytologie für den Nachweis von Knochentumoren bei Hund und Katze. *Tierärztliche Praxis Kleintiere*, **31**, 117-123.

Stoker, M. und H. Rubin, 1967: Density dependent inhibition of cell growth in culture. *Nature*, **215**, 171.

Straw, R., R. LeCouteur, B. Powers und S. Withrow, 1989a: Multilobular osteochondrosarcoma of the canine skull: 16 cases (1978-1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **195**, 1764-1769.

Straw, R., B. Powers, S. Withrow, M. Cooper und A. Turner, 1992a: The effect of intramedullary polymethylmethacrylate on healing of intercalary cortical allografts in a canine model. *Journal of orthopaedic research*, **10**, 434-439.

Straw, R., S. Withrow und B. Powers, 1992b: Partial or total hemipelvectomy in the management of sarcomas in nine dogs and two cats. *Veterinary Surgery*, **21**, 183-188.

Straw, R. C., N. L. Cook, S. M. LaRue, S. J. Withrow und R. H. Wrigley, 1989b: Radiographic bone surveys. *J Am Vet Med Assoc*, **195**, 1458.

Straw, R. C., B. E. Powers, J. Klausner, R. A. Henderson, W. B. Morrison, D. L. McCaw, H. J. Harvey, R. M. Jacobs und R. J. Berg, 1996: Canine mandibular osteosarcoma: 51 cases (1980-1992). *Journal of the American Animal Hospital Association*, **32**, 257-262.

Straw, R. C. und S. J. Withrow, 1996: Limb-sparing surgery versus amputation for dogs with bone tumors. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **26**, 135-143.

Straw, R. C., S. J. Withrow und B. E. Powers, 1990: Management of canine appendicular osteosarcoma. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **20**, 1141-1161.

Straw, R. C., S. J. Withrow, S. L. Richter, B. E. Powers, M. K. Klein, N. C. Postorino, S. M. LaRue, G. K. Ogilvie, D. M. Vail und W. B. Morrison, 1991: Amputation and cisplatin for treatment of canine osteosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **5**, 205-210.

Sutter, N. B. und E. A. Ostrander, 2004: Dog star rising: the canine genetic system. *Nature Reviews Genetics*, **5**, 900-910.

Switonski, M., I. Szczerbal und J. Nowacka, 2004: The dog genome map and its use in mammalian comparative genomics. *Journal of applied genetics*, **45**, 195-214.

Szewczyk, M., R. Lechowski und K. Zabielska, 2015: What do we know about canine osteosarcoma treatment?—review. *Veterinary research communications*, **39**, 61-67.

Ta, H. T., C. R. Dass, P. F. Choong und D. E. Dunstan, 2009: Osteosarcoma treatment: state of the art. *Cancer and Metastasis Reviews*, **28**, 247-263.

Tashjian, A. H. und D. Goltzman, 2008: On the Interpretation of Rat Carcinogenicity Studies for Human PTH (1-34) and Human PTH (1-84). *Journal of Bone and Mineral Research*, **23**, 803-811.

Taylor, W. F., J. C. IVINS, D. J. PRITCHARD, D. C. DAHLIN, G. S. GILCHRIST und J. H. EDMONSON, Trends and variability in survival among patients with osteosarcoma: a 7-year update. in *Proceedings of the Mayo Clinic Proceedings*, 1985, p. 91-104.

Teicher, B. A., 1994: Hypoxia and drug resistance. *Cancer and Metastasis Reviews*, **13**, 139-168.

Teicher, B. A., 1995: Physiologic mechanisms of therapeutic resistance. Blood flow and hypoxia. *Hematology/oncology clinics of North America*, **9**, 475.

Teicher, B. A., J. S. Lazo und A. C. Sartorelli, 1981: Classification of antineoplastic agents by their selective toxicities toward oxygenated and hypoxic tumor cells. *Cancer research*, **41**, 73-81.

Terech, P., E. Ostuni und R. Weiss, 1996: Structural study of cholesteryl anthraquinone-2-carboxylate (CAQ) physical organogels by neutron and X-ray small angle scattering. *The Journal of Physical Chemistry*, **100**, 3759-3766.

Thomann, K., 2016: Expression der Monocarboxylattransporter 1 und 4 beim kaninen oralen spindelzelligen Sarkom und deren Verwendung als Hypoxiemarker zur Unterscheidung von zyklischer und chronischer Hypoxie. Imu.

Thomas, R., H. J. Wang, P.-C. Tsai, C. F. Langford, S. P. Fosmire, C. M. Jubala, D. M. Getzy, G. R. Cutter, J. F. Modiano und M. Breen, 2009: Influence of genetic background on tumor karyotypes: evidence for breed-associated cytogenetic aberrations in canine appendicular osteosarcoma. *Chromosome Research*, **17**, 365-377.

Thompson, J. und M. Fugent, 1992: Evaluation of survival times after limb amputation, with and without subsequent administration of cisplatin, for treatment of appendicular osteosarcoma in dogs: 30 cases (1979-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **200**, 531-533.

Thrall, D. E., S. J. Withrow, B. E. Powers, R. C. Straw, R. L. Page, G. L. Heidner, D. C. Richardson, K. W. Bissonnette, C. W. Betts und D. J. DeYoung, 1990: Radiotherapy prior to cortical allograft limb sparing in dogs with osteosarcoma: a dose response assay. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, **18**, 1351-1357.

Tomlin, J., C. Sturgeon, M. Pead und P. Muir, 2000: Use of the bisphosphonate drug alendronate for palliative management of osteosarcoma. *The Veterinary Record*, **147**, 129-132.

Vail, D. M., I. D. Kurzman, P. C. Glawe, M. G. O'Brien, R. Chun, L. D. Garrett, J. E. Obradovich, R. M. Fred, C. Khanna und G. T. Colbern, 2002: STEALTH liposome-encapsulated cisplatin (SPI-77) versus carboplatin as adjuvant therapy for spontaneously arising osteosarcoma (OSA) in the dog: a randomized multicenter clinical trial. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, **50**, 131-136.

Vail, D. M. und E. G. Macewen, 2000: Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer investigation*, **18**, 781-792.

Van Ginkel, R. J., H. J. Hoekstra, F. J. Meutstege, J. W. Oosterhuis, D. R. Uges und H. S. Koops, 1995: Hyperthermic isolated regional perfusion with cisplatin in the local treatment of spontaneous canine osteosarcoma: Assessment of short-term effects. *Journal of surgical oncology*, **59**, 169-176.

Van Golen, K. L., L. Bao, G. J. Brewert, K. J. Pienta, J. M. Kamradt, D. L. Livant und S. D. Merajver, 2002: Suppression of tumor recurrence and metastasis by a combination of the PHSCN sequence and the antiangiogenic compound tetrathiomolybdate in prostate carcinoma. *Neoplasia*, **4**, 373-379.

Van Leeuwen, I., C. Cornelisse, W. Misdorp, S. Goedegebuure, J. Kirpensteijn und G. Rutteman, 1997: P53 gene mutations in osteosarcomas in the dog. *Cancer letters*, **111**, 173-178.

Varki, A., R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, J. D. Marth, C. R. Bertozzi, G. W. Hart und M. E. Etzler, 2009: Symbol nomenclature for glycan representation. *Proteomics*, **9**, 5398-5399.

Vaupel, P., Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. in *Proceedings of the Seminars in radiation oncology*, 2004, p. 198-206.

Vaupel, P., A. Mayer und M. Höckel, 2004: Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods in enzymology*, **381**, 335-354.

Voegelé, T. J., M. Voegelé-Kadletz, V. Esposito, K. Macfelda, U. Oberndorfer, V. Vecsei und R. Schabus, 1999: The effect of different isolation techniques on human osteoblast-like cell growth. *Anticancer research*, **20**, 3575-3581.

von Eisenhart-Rothe, R., A. Toepfer, M. Salzmann, J. Schauwecker, H. Gollwitzer und H. Rechl, 2011: Primär maligne Knochentumoren. *Der Orthopäde*, **40**, 1121-1142.

Von Werthern, C. H., C; Schwarz, G 1999: Zur Gliedmaßenamputation bei Hund und Katze: Eine Besitzerbefragung. *Kleintierprax.*

Wallack, S. T., E. R. Wisner, J. A. Werner, P. J. Walsh, M. S. Kent, R. A. Fairley und W. J. Hornof, 2002: Accuracy of magnetic resonance imaging for estimating intramedullary osteosarcoma extent in pre-operative planning of canine limb-salvage procedures. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, **43**, 432-441.

Walter, C., W. Dernell, S. LaRue, S. Lana, M. Lafferty, T. LaDue und S. Withrow, 2005: Curative-intent radiation therapy as a treatment modality for appendicular and axial osteosarcoma: a preliminary retrospective evaluation of 14 dogs with the disease. *Veterinary and comparative oncology*, **3**, 1-7.

Wang, G., T. Yin und Y. Wang, 2016a: In vitro and in vivo assessment of high-dose vitamin C against murine tumors. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **12**, 3058-3062.

Wang, H., Z. Feng, Y. Wang, R. Zhou, Z. Yang und B. Xu, 2016b: Integrating enzymatic self-assembly and mitochondria targeting for selectively killing cancer cells without acquired drug resistance. *Journal of the American Chemical Society*, **138**, 16046-16055.

Wang, H., Z. Feng, D. Wu, K. J. Fritzsche, M. Rigney, J. Zhou, Y. Jiang, K. Schmidt-Rohr und B. Xu, 2016c: Enzyme-regulated supramolecular assemblies of cholesterol conjugates against drug-resistant ovarian cancer cells. *Journal of the American Chemical Society*, **138**, 10758-10761.

Wang, R., C. Geiger, L. Chen, B. Swanson und D. G. Whitten, 2000: Direct observation of sol– gel conversion: the role of the solvent in organogel formation. *Journal of the American Chemical Society*, **122**, 2399-2400.

Ward, J. F., 1988: DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, **35**, 95-125.

Ward, W. und A. Hosseinian, 1994: Rehabilitation of Patients Following Resection of Extremity Soft Tissue Sarcomas. *Cancer control: journal of the Moffitt Cancer Center*, **1**, 606-612.

Weaver, B. A. und D. W. Cleveland, 2005: Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer cell*, **8**, 7-12.

Weidemann, A. und R. Johnson, 2008: Biology of HIF-1 α . *Cell Death & Differentiation*, **15**, 621-627.

Weigelt, B., J. L. Peterse und L. J. Van't Veer, 2005: Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature reviews cancer*, **5**, 591-602.

Weinmann, M., O. Thews, T. Schroeder und P. Vaupel, 2002: Expression pattern of the urokinase-plasminogen activator system in rat DS-sarcoma: Role of oxygenation status and tumour size. *British journal of cancer*, **86**, 1355-1361.

Welsh, R., F. Jensen, N. Cooper, M. Oldstone, B. Banapour, J. Sernatiriger, J. Levy, H. Hoshino, H. Tanaka und M. Miwa, 1996: Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *nature*, **379**.

Whelan, J., A. McTiernan, N. Cooper, Y. K. Wong, M. Francis, S. Vernon und S. J. Strauss, 2012: Incidence and survival of malignant bone sarcomas in England 1979–2007. *International journal of cancer*, **131**.

White, R., 1991: Mandibulectomy and maxillectomy in the dog: long term survival in 100 cases. *Journal of Small Animal Practice*, **32**, 69-74.

Whitesides, G. M. und B. Grzybowski, 2002: Self-assembly at all scales. *Science*, **295**, 2418-2421.

Wiesener, M. S. und P. H. Maxwell, 2003: HIF and oxygen sensing; as important to life as the air we breathe? *Annals of medicine*, **35**, 183-190.

Withers, H. R., 1975: The four R's of radiotherapy. *Adv Radiat Biol*, **5**, 241-271.

Withrow, S., 1980: En bloc resection of a juxtacortical and three intra-osseous osteosarcomas of the zygomatic arch in dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, **16**, 867-872.

Withrow, S., 1988: *Pulmonary metastasectomy for canine osteosarcoma.*, Estes Park, CO.

Withrow, S. J., J. M. Liptak, R. C. Straw, W. S. Dernell, V. J. Jameson, B. E. Powers, J. L. Johnson, J. H. Brekke und E. B. Douple, 2004: Biodegradable cisplatin polymer in limb-sparing surgery for canine osteosarcoma. *Annals of surgical oncology*, **11**, 705-713.

Withrow, S. J., R. Page und D. M. Vail, 2013: *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology-E-Book*. Elsevier Health Sciences.

Withrow, S. J., B. E. Powers, R. C. Straw und R. M. Wilkins, 1991: Comparative Aspects of Osteosarcoma: Dog Versus Man. *Clinical orthopaedics and related research*, **270**, 159-168.

Wittig, J. C., J. Bickels, K. L. Kellar-Graney, F. H. Kim und M. M. Malawer, 2002: Osteosarcoma of the proximal humerus: long-term results with limb-sparing surgery. *Clinical orthopaedics and related research*, **397**, 156-176.

Wolfesberger, B., I. Walter, C. Hoelzl, J. G. Thalhammer und M. Egerbacher, 2006: Antineoplastic effect of the cyclooxygenase inhibitor meloxicam on canine osteosarcoma cells. *Res Vet Sci*, **80**, 308-316.

Wolke, R. und S. Nielsen, 1966: Site incidence of canine osteosarcoma. *Journal of Small Animal Practice*, **7**, 489-492.

Yamagata, S. und T. Yamagata, 1984: FBJ virus-induced osteosarcoma contains type I, type I trimer, type III as well as type V collagens. *J Biochem*, **96**, 17-26.

Yamamoto, T., T. Hitora, T. Marui, T. Akisue, K. Nagira, T. Kawamoto, S. Yoshiya und M. Kurosaka, 2002: Reimplantation of autoclaved or irradiated cortical bones invaded by soft tissue sarcomas. *Anticancer research*, **22**, 3685-3690.

Yang, Z., H. Gu, D. Fu, P. Gao, J. K. Lam und B. Xu, 2004: Enzymatic formation of supramolecular hydrogels. *Advanced Materials*, **16**, 1440-1444.

Yang, Z., G. Liang und B. Xu, 2008: Enzymatic hydrogelation of small molecules. *Accounts of chemical research*, **41**, 315-326.

Zhao, F., Y. Gao, J. Shi, H. M. Browdy und B. Xu, 2010: Novel anisotropic supramolecular hydrogel with high stability over a wide pH range. *Langmuir*, **27**, 1510-1512.

Zhao, J. L., F. L. Chen, Q. Zhou, W. Pan, X. H. Wang, J. Xu, S. X. Zhang, L. Ni und H. L. Yang, 2016: B7- H3 protein expression in a murine model of osteosarcoma. *Oncology Letters*, **12**, 383-386.

Zhi, L.-Q., Y.-X. Yang, S.-X. Yao, Z. Qing und J.-B. Ma, 2018: Identification of Novel Target for Osteosarcoma by Network Analysis. *Medical Science Monitor*, **24**, 5914-5924.

Zhong, H., A. M. De Marzo, E. Laughner, M. Lim, D. A. Hilton, D. Zagzag, P. Buechler, W. B. Isaacs, G. L. Semenza und J. W. Simons, 1999: Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer research*, **59**, 5830-5835.

Zhou, H., P. Choong, R. McCarthy, S. Chou, T. Martin und K. W. Ng, 1994: In situ hybridization to show sequential expression of osteoblast gene markers during bone formation in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*, **9**, 1489-1499.

Zhou, J., X. Du, C. Berciu, H. He, J. Shi, D. Nicastro und B. Xu, 2016a: Enzyme-instructed self-assembly for spatiotemporal profiling of the activities of alkaline phosphatases on live cells. *Chem*, **1**, 246-263.

Zhou, J., X. Du, J. Li, N. Yamagata und B. Xu, 2015: Taurine boosts cellular uptake of small D-peptides for enzyme-instructed intracellular molecular self-assembly. *Journal of the American Chemical Society*, **137**, 10040-10043.

Zhou, J., X. Du, N. Yamagata und B. Xu, 2016b: Enzyme-instructed self-assembly of small D-peptides as a multiple-step process for selectively killing cancer cells. *Journal of the American Chemical Society*, **138**, 3813-3823.

Zhou, J. und B. Xu, 2015: Enzyme-instructed self-assembly: a multistep process for potential cancer therapy. *Bioconjugate chemistry*, **26**, 987-999.

IX. ANHANG

1. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: ENNEKING-EINTEILUNG AUS (FREYSCHMIDT ET AL., 2010)	17
ABBILDUNG 2: VERSCHIEDENE ARTEN VON RESEKTIONSRÄNDERN AUS (ENNEKING ET AL., 1980)	18
ABBILDUNG 3: ENZYMATISCHE TRANSFORMATION VON FORM 1 IN FORM 2 IN ALP-GENGENWART AUS (PIRES, ABUL-HAJJA ET AL. 2015).	51
ABBILDUNG 4: FUNKTIONSPRINZIP DES AKA AUS (PIRES, ABUL-HAJJA ET AL. 2015). ZELLEN OHNE ALP-PRODUKTION ZEIGEN PHYSIOLOGISCHE MORPHOLOGIE, WÄHREND ALP-PRODUZIERENDE ZELLEN APOPTOTISCH WERDEN.	51
ABBILDUNG 5: <i>IN VITRO</i> -VERSUCHE MIT UNBEHANDELTEN OSTEOSARKOMZELLEN (SAOs2), PRÄCHONDROZYTEN (ATDC5) UND OSTEOSARKOMZELLEN IN KOMBINATION MIT PHOSPHATASE-INHIBITOR AUS (PIRES, ABUL-HAJJA ET AL. 2015). ALP=ALKALISCHE PHOSPHATASE.	52
ABBILDUNG 6: GENLOCI UND ISOFORMEN DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE (AP) AUS (GRESSNER AND ARNDT 2013).....	53
ABBILDUNG 7: WACHSTUMSKINETIK VON TUMOREN NACH GOMPERTZ AUS (HOLDENER, 1985)	55
ABBILDUNG 8: HIF UND SEINE ZIELGENE AUS (BERTOUT ET AL., 2008).....	58
ABBILDUNG 9 : FUNKTIONSPRINZIP VISISens-TD. IN GEGENWART VON SAUERSTOFF VERRINGERT SICH DIE LICHEMISSION AUFGRUND DES ENERGIETRANSFERS. (HTTPS://WWW.PRESENS.DE/KNOWLEDGE/BASICS/DETAIL/MEASUREMENT-PRINCIPLE-OF-CHEMICAL-OPTICAL-SENSORS-901.HTML)	71
ABBILDUNG 10: ÜBERSICHT DES VERSUCHSABLAUFS. ES SIND DIE JEWEILIGEN ZEITPUNKTE UND INTERVENTIONEN DARGESTELLT. KREUZE MARKIEREN DIE HISTOLOGIEZEITPUNKTE. AKA= AROMATISCHES KOHLENWASSERSTOFFAMPHIPHIL, BE= BLUTENTNAHME, MM= MILLIMOLAR, TGL.= TÄGLICH.	76
ABBILDUNG 11: INTRATIBIALE APPLIKATION VON OSTEOSARKOMZELLEN AUS (PARK ET AL., 2010). IN BILD A WIRD DIE POSITIONIERUNG DES BEINS GEZEIGT (BEUGUNG DES KNIEGELENKS UND LATERALISIERUNG DES BEINS). IN BILD B WIRD DIE KANÜLE AUF DEM TIBIAKAMM POSITIONIERT UND UNTER ROTATION EINGEDREHT. BEI KORREKTER POSITIONIERUNG BEFINDET SICH DIE KANÜLE PARALLEL ZUR TIBIAACHSE (BILD C).	77
ABBILDUNG 12: RÖNTGENOLOGISCHE VERIFIZIERUNG DER KORREKTEN KANÜLENPOSITION.....	78
ABBILDUNG 13: INTRATIBIALE SAUERSTOFFMESSUNG MIT EINEM PST-1-SENSOR (PRESENS), PFEIL ZEIGT AUF IMPLANTATIONSSTELLE.....	81
ABBILDUNG 14: FÜR DIE ANALYSE IN CTAN-SOFTWARE VERWENDETER PROXIMALER TIBIA TEIL (ROTES KÄSTCHEN).	83
ABBILDUNG 15: KALIBRATIONSMASKE DER CTAN-SOFTWARE. BMD= BONE MINERAL DENSITY, AC= ATTENUATION COEFFICIENT. g/cm^3 = GRAMM PRO KUBIKZENTIMETER.	84
ABBILDUNG 16: ÜBERSICHT ZELLVIABILITÄTS-ERGEBNISSE MITTELS MTT-TEST NACH 1, 7, 24 UND 48 STUNDEN. ALS KONTROLLE FUNGIERTEN UNBEHANDELTE K7M2-ZELLEN. DIE STATISTISCHE ANALYSE ERFOLGTE	

MITTELS KRUSKAL-WALLIS-TEST KOMBINIERT MIT MULTIPLN VERGLEICHSTESTS NACH DUNN.

SIGNIFIKANZLEVEL WURDEN WIE FOLGT GEKENNZEICHNET: $P < 0,05$ (*) UND $P < 0,01$ (**). AKA=

AROMATISCHES KOHLENWASSERSTOFF-AMPHIPHIL, MM= MILLIMOLAR.....92

ABBILDUNG 17: MTT-ERGEBNISSE NACH 3 UND 7 TAGEN. MIT 0,5 % TRITON BEHANDELTE K7M2-ZELLEN

DIENTEN ALS NEGATIVKONTROLLE, UNBEHANDELTE K7M2-ZELLEN ALS POSITIVKONTROLLE. DIE

STATISTISCHE ANALYSE ERFOLGTE MITTELS KRUSKAL-WALLIS-TEST KOMBINIERT MIT MULTIPLN

VERGLEICHSTESTS NACH DUNN. SIGNIFIKANZLEVEL WURDEN WIE FOLGT GEKENNZEICHNET: $P < 0,05$ (*) UND

$P < 0,01$ (**). AKA= AROMATISCHES KOHLENWASSERSTOFF-AMPHIPHIL, MM= MILLIMOLAR.....92

ABBILDUNG 18: ERGEBNISSE DNA-QUANTIFIZIERUNG VON KONTROLLGRUPPE (UNBEHANDELTE K7M2-ZELLEN)

UND 1 MM-AKA-GRUPPE NACH 7 TAGEN. DIE STATISTISCHE ANALYSE ERFOLGTE MITTELS WILCOXON-

MANN-WHITNEY-TEST. SIGNIFIKANZLEVEL WURDEN WIE FOLGT GEKENNZEICHNET: $P < 0,01$ (**). AKA=

AROMATISCHES KOHLENWASSERSTOFF-AMPHIPHIL, DNA= DESOXYRIBONUCLEIN ACID, MM= MILLIMOLAR.

.....93

ABBILDUNG 19: ÜBERSICHT MIKROSKOPIEBILDER VON KONTROLLE (UNBEHANDELTE K7M2-ZELLEN) UND 2 MM-

GRUPPE (K7M2-ZELLEN, DIE EINER 2 MM DOSIS AKA AUSGESETZT WAREN) ZU DEN ZEITPUNKTEN 48 H

UND 7 TAGE. DIE VIER LINKEN BILDER WURDEN IM HELLFELD BEI 10-FACHER VERGRÖßERUNG

MIKROSKOPIERT. DIE ZWEI RECHTEN BILDER NACH FÄRBUNG MIT CALCEIN UND PI BEI 10-FACHER

VERGRÖßERUNG IM ROT- UND GRÜNFLUORESZENZKANAL (ANSCHLIEßEND ÜBERLAGERT).

AKA=AROMATISCHES KOHLENWASSERSTOFF-AMPHIPHIL, D= TAGE, MM=MILLIMOLAR,

PI=PROPIDIUMIODID.....94

ABBILDUNG 20: ERGEBNISSE SAUERSTOFFMESSUNGEN MITTELS VISISSENS-SYSTEM INNERHALB DES ERSTEN TAGES

(24H) UND ZWEITEN TAGES (48H) BEI KONTROLLGRUPPE (UNBEHANDELTE K7M2-ZELLEN), 0,5 MM-

GRUPPE (K7M2-ZELLEN, DIE 0,5 MM AKA EXPONIERT WAREN) UND 1 MM-GRUPPE (K7M2-ZELLEN, DIE

1MM AKA EXPONIERT WAREN). DIE ABBILDUNG ZEIGT DIE MITTELWERTE INKLUSIVE

STANDARDABWEICHUNG. DIE STATISTISCHE ANALYSE ERFOLGTE MITTELS FRIEDMAN-TEST KOMBINIERT MIT

MULTIPLN VERGLEICHSTESTS NACH DUNN. ES KONNTE KEINERLEI STATISTISCHE SIGNIFIKANZ ERMITTELT

WERDEN. AKA= AROMATISCHES KOHLENWASSERSTOFF-AMPHIPHIL, MM= MILLIMOLAR.95

ABBILDUNG 21: BILATERALE POSTAURIKULÄRE ALOPEZIE (*) BEI EINER MAUS DER 10 MM-AKA-GRUPPE. MM=

MILLIMOLAR, AKA= AROMATISCHES KOHLENWASSERSTOFF-AMPHIPHIL.....96

ABBILDUNG 22 : GEWICHTSENTWICKLUNG ALLER VERSUCHSGRUPPEN IM ZEITLICHEN VERLAUF. DER GRAPH ZEIGT

DIE MITTELWERTE DER VERSUCHSGRUPPEN. TZ = TUMORZELLEN, MM= MILLIMOLAR.97

ABBILDUNG 23 : GEWICHTE ALLER VERSUCHSGRUPPEN ZU VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN. DIE ABBILDUNG ZEIGT

DIE MAXIMAL- UND MINIMALWERTE, SOWIE 25 %-, 75 %-PERZENTIL UND MEDIANWERTE. DIE

STATISTISCHE ANALYSE ERFOLGTE MITTELS KRUSKAL-WALLIS-TEST KOMBINIERT MIT MULTIPLN

VERGLEICHSTESTS NACH DUNN. SIGNIFIKANZLEVEL WURDEN WIE FOLGT GEKENNZEICHNET: $P < 0,05$ (*); $P <$

$0,01$ () UND $P < 0,0001$ (***). TZ = TUMORZELLEN, MM= MILLIMOLAR, AKA= AROMATISCHES**

KOHLENWASSERSTOFF-AMPHIPHIL.....98

ABBILDUNG 24 : VON AUßEN SICHTBARER TUMOR AN PROXIMALER TIBIA (MIT ROTEM KREIS MARKIERT).99

ABBILDUNG 25 : RÖNTGENOLOGISCHE DOKUMENTATION DER TUMORPROGRESSION MITTELS μ CT. TUMOREN DER

PROXIMALEN TIBIA SIND MIT ROTEM KÄSTCHEN MARKIERT. ES WURDE JEWEILS DER SCAN EINER REPRÄSENTATIVEN MAUS PRO GRUPPE UND ZEITPUNKT AUSGEWÄHLT. TZ = TUMORZELLEN, mM= MILLIMOLAR, AKA= AROMATISCHES KOHLENWASSERSTOFFAMPHIPHIL.	100
ABBILDUNG 26 : RÖNTGENOLOGISCHE DOKUMENTATION DES PULMONALEN METASTASIERUNGSSTATUS MITTELS μCT. H MARKIERT DAS HERZ. ES WURDE JEWEILS DER SCAN EINER REPRÄSENTATIVEN MAUS PRO GRUPPE UND ZEITPUNKT AUSGEWÄHLT. TZ = TUMORZELLEN, mM= MILLIMOLAR, AKA= AROMATISCHES KOHLENWASSERSTOFF-AMPHIPHIL.....	102
ABBILDUNG 27: ÜBERSICHT ÜBER DAS GESAMTGEWEBEVOLUMEN (TV) BEI ALLEN GRUPPEN ZU FÜNF ZEITPUNKTEN. DIE ABBILDUNG ZEIGT DIE DIE MAXIMAL- UND MINIMALWERTE, SOWIE 25 %-, 75 %-PERZENTIL UND MEDIANWERTE. DIE STATISTISCHE ANALYSE ERFOLGTE MITTELS KRUSKAL-WALLIS-TEST KOMBINIERT MIT MULTIPLER VERGLEICHSTESTS NACH DUNN. SIGNIFIKANZLEVEL WURDEN WIE FOLGT GEKENNZEICHNET: P < 0,05 (*), P < 0,01 (**), P < 0,001 (***). TZ = TUMORZELLEN, mM= MILLIMOLAR, AKA= AROMATISCHES KOHLENWASSERSTOFF-AMPHIPHIL.	104
ABBILDUNG 28: DAS TOTALE KNOCHENVOLUMEN VERGLEICHEN INNERHALB DER GRUPPEN AN UNTERSCHIEDLICHEN ZEITPUNKTEN. DIE ABBILDUNG ZEIGT DIE MAXIMAL- UND MINIMALWERTE, SOWIE 25 %-, 75 %-PERZENTIL UND MEDIANWERTE. DIE STATISTISCHE ANALYSE ERFOLGTE MITTELS KRUSKAL-WALLIS-TEST KOMBINIERT MIT MULTIPLER VERGLEICHSTESTS NACH DUNN. SIGNIFIKANZLEVEL WURDEN WIE FOLGT GEKENNZEICHNET: P < 0,05 (*); P < 0,01 (**) UND P < 0,0001 (****). TZ = TUMORZELLEN, mM= MILLIMOLAR, AKA= AROMATISCHES KOHLENWASSERSTOFF-AMPHIPHIL.....	106
ABBILDUNG 29: ÜBERSICHT ÜBER DAS VERHÄLTNISS VON GESAMTGEWEBEVOLUMEN ZU KNOCHENVOLUMEN IM VERGLEICH ZWISCHEN DEN VERSCHIEDENEN GRUPPEN ZU UNTERSCHIEDLICHEN ZEITPUNKTEN. DIE ABBILDUNG ZEIGT DIE MAXIMAL- UND MINIMALWERTE, SOWIE 25 %-, 75 %-PERZENTIL UND MEDIANWERTE. DIE STATISTISCHE ANALYSE ERFOLGTE MITTELS KRUSKAL-WALLIS-TEST KOMBINIERT MIT MULTIPLER VERGLEICHSTESTS NACH DUNN. SIGNIFIKANZLEVEL WURDEN WIE FOLGT GEKENNZEICHNET: P < 0,05 (*); P < 0,01 (**) UND P < 0,001 (***). BV= BONE VOLUME, TV= TISSUE VOLUME, TZ = TUMORZELLEN, mM= MILLIMOLAR, AKA= AROMATISCHES KOHLENWASSERSTOFF-AMPHIPHIL.....	108
ABBILDUNG 30: ÜBERSICHT ÜBER KNOCHENMINERALDICHTEN DER FÜNF VERSUCHSGRUPPEN ZU VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN. DIE ABBILDUNG ZEIGT DIE MAXIMAL- UND MINIMALWERTE, SOWIE 25 %-, 75 %-PERZENTIL UND MEDIANWERTE. DIE STATISTISCHE ANALYSE ERFOLGTE MITTELS KRUSKAL-WALLIS-TEST KOMBINIERT MIT MULTIPLER VERGLEICHSTESTS NACH DUNN. SIGNIFIKANZLEVEL WURDEN WIE FOLGT GEKENNZEICHNET: P < 0,05 (*); P < 0,005 (**) UND P < 0,001 (***). AKA= AROMATISCHES KOHLENWASSERSTOFF-AMPHIPHIL, HA= HYDROXYAPATIT, mM= MILLIMOLAR, TZ = TUMORZELLEN.	110
ABBILDUNG 31 : INTRATIBIALE SAUERSTOFFWERTE AUFGESPLITTET NACH VERSUCHSGRUPPEN AN TAG 50. DIE ABBILDUNG ZEIGT DIE DIE MAXIMAL- UND MINIMALWERTE, SOWIE 25%-, 75%-PERZENTIL UND MEDIANWERTE. DIE STATISTISCHE ANALYSE ERFOLGTE MITTELS KRUSKAL-WALLIS-TEST KOMBINIERT MIT MULTIPLER VERGLEICHSTESTS NACH DUNN. TZ = TUMORZELLEN, mM= MILLIMOLAR, AKA= AROMATISCHES KOHLENWASSERSTOFF-AMPHIPHIL. ES KONNTE KEINERLEI STATISTISCHE SIGNIFIKANZ NACHGEWIESEN WERDEN (N.S. = NICHT SIGNIFIKANT).	112
ABBILDUNG 32 : ÜBERSICHT VEGF-KONZENTRATION IN PLASMAPROBEN ZU ALLEN FÜNF ZEITPUNKTEN. DIE	

ABBILDUNG ZEIGT DIE MITTELWERTE INKLUSIVE STANDARDABWEICHUNG. DIE STATISTISCHE ANALYSE ERFOLGTE MITTELS KRUSKAL-WALLIS-TEST KOMBINIERT MIT MULTIPLLEN VERGLEICHSTESTS NACH DUNN. SIGNIFIKANZLEVEL WURDEN WIE FOLGT GEKENNZEICHNET: $P < 0,05$ (*). TZ = TUMORZELLEN, MM= MILLIMOLAR, AKA= AROMATISCHES KOHLENWASSERSTOFF-AMPHIPHIL, VEGF= VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR.	114
ABBILDUNG 33: ÜBERSICHT BEISPIELHAFTER HISTOLOGISCHER SCHNITTE DER PROXIMALEN TIBIA IN H.E.-FÄRBUNG (LINKE SEITE) UND MASSON-GOLDNER-TRICHROM-FÄRBUNG (RECHTE SEITE). DIE OBERSTE REIHE STELLT DEN PHYSIOLOGISCHEN ZUSTAND DAR, WÄHREND DIE RESTLICHEN REIHEN TIBIAE MIT OSTEOSARKOM (#) ZEIGEN. AKA= AROMATISCHES KOHLENWASSERSTOFF-AMPHIPHIL, TZ= TUMORZELLEN, MM= MILLIMOLAR.	116
ABBILDUNG 34: VERGRÖßERUNGEN DER OSTEOSARKOME (H.-E.-FÄRBUNG) BEI UNBEHANDELTEN (NUR TUMORZELLEN-) (A), VEHIKEL- (B), MIT 1 MM AKA-BEHANDELTER GRUPPE (C) UND MIT 10 MM AKA-BEHANDELTER GRUPPE (D) ZUM ZEITPUNKT TAG 50. H= MIT KNOCHENMARK GEFÜLLTER HOHLRAUM, K=KALK, + = NEUTROPHILE GRANULOZYTEN, †= NEKROSE, IN OSTEOID EINGEBETTETE CHONDROZYTEN SIND MIT EINEM PFEIL MARKIERT. AKA= AROMATISCHES KOHLENWASSERSTOFF-AMPHIPHIL, MM= MILLIMOLAR, TZ= TUMORZELLEN.	118
ABBILDUNG 35: ÜBERSICHT REPRÄSENTATIVER HISTOLOGISCHER SCHNITTE DER LUNGE IN H.E.-FÄRBUNG. DAS OBERE BILD ZEIGT DIE LUNGE EINER MAUS, DER KEINE TUMORZELLEN IMPLANTIERT WURDEN. ALVEOLEN (*), BRONCHIOLUS (◊). IN REIHE 2 UND 3 SIND LUNGEN DER RESTLICHEN VIER GRUPPEN ZUM ZEITPUNKT TAG 50 ZU SEHEN. AKA= AROMATISCHES KOHLENWASSERSTOFF-AMPHIPHIL, MM= MILLIMOLAR, TZ= TUMORZELLEN.	119
ABBILDUNG 36: ÜBERSICHT REPRÄSENTATIVER HISTOLOGISCHER SCHNITTE DER LEBER IN H.E.-FÄRBUNG. DIE OBERE REIHE ZEIGT DIE LEBER EINER MAUS, DER KEINE TUMORZELLEN IMPLANTIERT WURDEN. DAS LINKE BILD ZEIGT DIE ÜBERSICHT UND DAS RECHTE EINE NAHAUFNAHME MIT LEBERPARENCHYM (~) UND BLUTGEFÄß (+), SOWIE FOKALER MONONUKLEARER INFILTRATION (PFEIL). IN REIHE 2 UND 3 SIND LEBERN DER RESTLICHEN VIER GRUPPEN ZUM ZEITPUNKT TAG 50 ZU SEHEN. AKA= AROMATISCHES KOHLENWASSERSTOFF-AMPHIPHIL, MM= MILLIMOLAR, TZ= TUMORZELLEN.	120
ABBILDUNG 37: ÜBERSICHT REPRÄSENTATIVER HISTOLOGISCHER SCHNITTE DER NIERE VON MÄUSEN, DENEN KEINE TUMORZELLEN IMPLANTIERT WURDEN IN H.E.- (LINKS) UND PAS-FÄRBUNG (RECHTS) AN TAG 20. DIE OBERE REIHE ZEIGT ÜBERSICHTSBILDER UND DIE UNTERE REIHE NAHAUFNAHMEN MIT GLOMERULUM (KREIS) UND TUBULI (PFEIL). MM= MILLIMOLAR, TZ= TUMORZELLEN.	121
ABBILDUNG 38: ÜBERSICHT REPRÄSENTATIVER HISTOLOGISCHER SCHNITTE DER NIERE IN H.E.- (LINKS) UND PAS-FÄRBUNG (RECHTS) DER NUR TUMORZELLEN-, VEHIKEL-, 1 MM- UND 10 MM-GRUPPE ZUM ZEITPUNKT TAG 50 ZU SEHEN. KREIS= GLOMERULUM UND PFEIL= TUBULI. AKA= AROMATISCHES KOHLENWASSERSTOFF-AMPHIPHIL, MM= MILLIMOLAR, TZ= TUMORZELLEN.	122

2. Copyright-Bescheinigungen verwendeter Abbildungen

Abbildung 1

License Number	4425940774043
License date	Sep 11, 2018
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Springer eBook
Licensed Content Title	Staging der Knochentumoren
Licensed Content Author	Jürgen Freyschmidt, Helmut Ostertag, Gernot Jundt
Licensed Content Date	Jan 1, 2010
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	no
Title	Einfluss eines neuartigen aromatischen Kohlenwasserstoff-Amphiphils auf Tumorgenese und Metastasierung des Osteosarkoms im murinen Modell
Instructor name	Prof. Andrea Meyer-Lindenberg
Institution name	Chirurgische und gynäkologische Tierklinik der LMU München
Expected presentation date	Aug 2019
Portions	Tabelle 5.1

Abbildung 2

License Number	4425960661072
License date	Sep 11, 2018
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Der Orthopäde
Licensed Content Title	Primär maligne Knochentumoren
Licensed Content Author	R. von Eisenhart-Rothe, A. Toepfer, M. Salzmann et al
Licensed Content Date	Jan 1, 2011
Licensed Content Volume	40
Licensed Content Issue	12
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	no
Title	Einfluss eines neuartigen aromatischen Kohlenwasserstoff-Amphiphils auf Tumorgenese und Metastasierung des Osteosarkoms im murinen Modell
Instructor name	Prof. Andrea Meyer-Lindenberg
Institution name	Chirurgische und gynäkologische Tierklinik der LMU München
Expected presentation date	Aug 2019
Portions	Abb.1

Abbildung 3, 4, 5



ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Title: Controlling Cancer Cell Fate Using Localized Biocatalytic Self-Assembly of an Aromatic Carbohydrate Amphiphile

Author: Ricardo A. Pires, Yousef M. Abul-Haija, Diana S. Costa, et al

Publication: Journal of the American Chemical Society

Publisher: American Chemical Society

Date: Jan 1, 2015

Copyright © 2015, American Chemical Society

Logged in as:
Laura Heimann
Klinikum rechts der Isar,
TU München

Account #:
3001333998

LOGOUT

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

Abbildung 6

License Number	4426500215927
License date	Sep 12, 2018
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Springer eBook
Licensed Content Title	P
Licensed Content Author	Axel M. Gressner, Torsten Arndt
Licensed Content Date	Jan 1, 2013
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	no
Title	Einfluss eines neuartigen aromatischen Kohlenwasserstoff-Amphiphils auf Tumorgenese und Metastasierung des Osteosarkoms im murinen Modell
Instructor name	Prof. Andrea Meyer-Lindenberg
Institution name	Chirurgische und gynäkologische Tierklinik der LMU München
Expected presentation date	Aug 2019
Portions	Phosphatase, alkalische, Abb. 1. AP-Kodierung von vier differentiellen Genloci auf zwei separaten Chromosomen

Abbildung 7

License Number	4426941057365
License date	Sep 13, 2018
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Springer eBook
Licensed Content Title	Grundlagen der medikamentösen Krebstherapie
Licensed Content Author	E. E. Holdener
Licensed Content Date	Jan 1, 1985
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	no
Title	Einfluss eines neuartigen aromatischen Kohlenwasserstoff-Amphiphils auf Tumorgenese und Metastasierung des Osteosarkoms im murinen Modell
Instructor name	Prof. Andrea Meyer-Lindenberg
Institution name	Chirurgische und gynäkologische Tierklinik der LMU München
Expected presentation date	Aug 2019
Portions	Abb. 3 Tumorwachstumskurve nach Gompertz

Abbildung 8

License Number	4426470776860
License date	Sep 12, 2018
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Nature Reviews Cancer
Licensed Content Title	The impact of O ₂ availability on human cancer
Licensed Content Author	Jessica A. Bertout, Shetal A. Patel, M. Celeste Simon
Licensed Content Date	Nov 6, 2008
Licensed Content Volume	8
Licensed Content Issue	12
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	no
Title	Einfluss eines neuartigen aromatischen Kohlenwasserstoff-Amphiphils auf Tumorgenese und Metastasierung des Osteosarkoms im murinen Modell
Instructor name	Prof. Andrea Meyer-Lindenberg
Institution name	Chirurgische und gynäkologische Tierklinik der LMU München
Expected presentation date	Aug 2019
Portions	Figure 1: Genes activated by hypoxia-inducible factors (HIFs) that are involved in tumour progression.

Abbildung 9

Zustimmung / WG: Copyright



Achim Stangelmayer <achim.stangelmayer@presens.de>

Allen antworten | v

Do 13.12.2018 09:47

An: Heimann, Laura

Cc: 'Meister, Katrin' <katrin.meister@presens.de>; 'Liebsch, Gregor' <Gregor.Liebsch@presens.de>; 'John, Gernot Thomas' <G.John@presens.de>; 'Gutbrod, Martin' <Martin.Gutbrod@presens.de>

Sehr geehrte Frau Heimann,

hiermit erteile ich ihnen das Copyright für u g Grafik(en).

Viel Erfolg !

Mit freundlichen Gruessen,

Achim Stangelmayer, CEO

Abbildung 11



Mi 12.09.2018 17:03

Wiley Global Permissions <permissions@wiley.com>

RE: Figure for dissertation

An: ☐ Heimann, Laura

Dear Laura,

Thank you for your email.

Permission is granted for you to use the material requested for your thesis/dissertation subject to the usual acknowledgements (author, title of material, title of book/journal, ourselves as publisher) and on the understanding that you will reapply for permission if you wish to distribute or publish your thesis/dissertation commercially.

You should also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Material. Permission is granted solely for use in conjunction with the thesis, and the material may not be posted online separately.

Any third-party material is expressly excluded from this permission. If any material appears within the article with credit to another source, authorisation from that source must be obtained.

Many thanks,

Orla Davies
Rights Assistant
John Wiley & Sons Ltd

WILEY

From: Heimann, Laura [mailto:laura.heimann@tum.de]

Sent: 12 September 2018 13:17

To: Wiley Global Permissions <permissions@wiley.com>

Subject: Figure for dissertation

Dear Sir or Madam,

I would like to ask for permission to use figure 14.15.3 of the paper „Preclinical Mouse Models of Human Prostate Cancer and Their Utility in Drug Discovery“ (Serk In Park 2010) for my dissertation.

3. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: PATHOLOGISCHE SYSTEMATIK VON TUMOREN AUS (HERMANN, 2015).....	3
TABELLE 2: ÜBERLEBENSZEITEN VERSCHIEDENER THERAPIEMAßNAHMEN DES APPENDIKULÄREN OSTEOSARKOMS. MODIFIZIERT NACH (KESSLER UND AMMER, 2013).	26
TABELLE 3: ÜBERBLICK ÜBER PROGNOSTISCHE FAKTOREN DES OSTEOSARKOMS.....	30
TABELLE 4: VERGLEICHENDE ÜBERSICHT DER EIGENSCHAFTEN DES KANINEN UND HUMANEN OSTEOSARKOMS MODIFIZIERT NACH (MORELLO ET AL., 2011) UND (FENGER ET AL., 2014)	41
TABELLE 5: VERWENDETE GERÄTE <i>IN VITRO</i> -VERSUCH	61
TABELLE 6: VERWENDETE GERÄTE <i>IN VIVO</i> -VERSUCH.....	62
TABELLE 7: VERWENDETE GERÄTE HISTOLOGIE	62
TABELLE 8: VERWENDETE VERBRAUCHSMATERIALIEN <i>IN VITRO</i> -VERSUCH.....	62
TABELLE 9: VERWENDETE VERBRAUCHSMATERIALIEN <i>IN VIVO</i> -VERSUCH	63
TABELLE 10: VERWENDETE VERBRAUCHSMATERIALIEN TIERHALTUNG	64
TABELLE 11: VERWENDETE VERBRAUCHSMATERIALIEN HISTOLOGIE	64
TABELLE 12: VERWENDETE PUFFER, MEDIEN UND LÖSUNGEN <i>IN VITRO</i> -VERSUCHE	64
TABELLE 13: VERWENDETE PUFFER, MEDIEN UND LÖSUNGEN <i>IN VIVO</i> -VERSUCHE.....	65
TABELLE 14: VERWENDETE PUFFER, MEDIEN UND LÖSUNGEN HISTOLOGIE	65
TABELLE 15: VERWENDETE FÄRBE LÖSUNGEN FÜR MIKROSKOPIE UND HISTOLOGIE	66
TABELLE 16: ÜBERSICHT DER VERSUCHSTIERGRUPPEN UND JEWELIGE TIERANZAHL	75
TABELLE 17: ÜBERSICHT MAUSANZAHL PRO GRUPPE UND ZEITPUNKT FÜR DIE INTRATIBIALE SAUERSTOFFMESSUNG	82
TABELLE 18: ÜBERSICHT MAUSANZAHL PRO GRUPPE UND ZEITPUNKT FÜR DIE μ CT-ANALYSE	85
TABELLE 19: ÜBERSICHT MAUSANZAHL PRO GRUPPE UND ZEITPUNKT FÜR DIE PLASMAPROBENANALYSE MITTELS LUMINEX MAGPIX. NACH DEM SCHRÄGSTRICH IST JEWEILS DIE GESAMTZAHL DER VERBLIEBENEN TIERE ZUM ENTSPRECHENDEN ZEITPUNKT ANGEZEIGT	86
TABELLE 20: DESKRIPTIVE STATISTIK DER GEWICHTS ERGEBNISSE	98
TABELLE 21: DESKRIPTIVE STATISTIK ZU DEN ERGEBNISSEN DES GESAMTGEWEBEVOLUMENS.....	104
TABELLE 22: DESKRIPTIVE STATISTIK DER ERGEBNISSE ZUM TOTALEN KNOCHENVOLUMEN	106
TABELLE 23: DESKRIPTIVE STATISTIK ZU ERGEBNISSEN TV/BV %	108
TABELLE 24: DESKRIPTIVE STATISTIK DER KNOCHENMINERALDICHTER-ERGEBNISSE.....	110
TABELLE 25: DESKRIPTIVE STATISTIK DER VEGF-WERTE	114

4. Scoresheet

Beobachtung	Parameter	Score
1. Allgemeine Kriterien		
Verhalten	Aufmerksam, aktiv, Sozialkontakte, bewegt sich normal, neugierig	0
	Verminderte Reaktionen, bewegt sich reduziert, eingeschränkte oder überhöhte Aktivität	1
	Kauerhaltung, teilweises Absondern von der Gruppe, bewegt sich reduziert, Schmerzen beim Gehen ersichtlich	2
	Apathisch, keine Reaktion oder Aggressivität/Schmerzäußerungen beim Handling, stark eingeschränkte Bewegung, Isolation, Automutilation, Kauerhaltung	3
Verhalten auf Provokation	Zeigt aktives Fluchtverhalten	0
	Verminderte oder übersteigerte Reaktionen	2
	Apathisch, keine Reaktion beim Handling, stark eingeschränkte Bewegung	3
Äußere Erscheinung	Glattes, glänzendes Fell, Fellpflege, Augen glänzend	0
	Mattes Fell, Fellpflege eingeschränkt oder fehlend, Augen trüb	1
	Teilweises struppiges, leicht gesträubtes Fell, Augen- und Nasenausfluss, Augen eingesunken, aufgetriebener Leib, verklebte Körperöffnungen	2
	Vollständig struppiges, stumpfes Fell, abnormale (z.B. kauende) Haltung, gekrümmter Rücken, Augen geschlossen, Lähmung, Stelzgang, aufgetriebener Leib	3
BCS	BC 3: Maus ist gut konditioniert, Wirbel und dorsales Becken nicht prominent, palpierbar bei leichter Druckausübung	0
	BC 2: Maus ist unterkonditioniert, evidente Segmentierung der Wirbelsäule	1
	BC 1: Maus ist abgemagert, skelettale Strukturen sehr prominent, keine oder kaum Gewebebedeckung, Wirbelsäule deutlichst segmentiert	3
Kotkonsistenz	Geformt	0

	Breig	1
	Flüssig	2
Gewicht	Kein Gewichtsverlust	0
	0-5% Gewichtsverlust	1
	6-15% Gewichtsverlust	2
	>15% Gewichtsverlust	3
2. Versuchs-spezifische Kriterien		
Tumorgroße	<0,8 cm Größe, < 3-facher Tibiadurchmesser	0
	0,8-1,4 cm Größe, ≤ 3- bis 7-facher Tibiadurchmesser	2
	≥1,5 cm Größe, > 7-facher Tibiadurchmesser	3
Lahmheit	keine Bewegungseinschränkung des betroffenen Beines	0
	geringe Bewegungseinschränkung des betroffenen Beines, leichte Entlastung	1
	Mittelgradige Bewegungseinschränkung des betroffenen Beines, mittelgradige Entlastung	2
	deutliche Bewegungseinschränkung des betroffenen Beines, Nachziehen, deutliche Entlastung, Fraktur der Tibia	3
Schmerzen	Verminderte Aktivität	1
	Verminderte Erregbarkeit auf Reize	2
	Krämpfe, Lähmungen	3
	Gekrümmter Rücken	3
	Apathie	3
Einstichstelle	Trocken, nicht nässend, rosa	0
	Leicht gerötet, leicht nässend und ödematös	2
	Deutlich gerötet, putride Wundinfektion, starke Schwellung, Hautnekrose	3
Atmung (Lungenmetastasen)	Physiologischer Atmungstyp und -frequenz	0
	Angestrenzte Atmung, erhöhte Atmungsfrequenz	1

	Sehr angestrenzte Atmung, stark erhöhte Atemfrequenz	2
	Dyspnoe, Zyanose	3

5. **Aufzeichnungsmuster Kohlenwasserstoff-Amphiphile zur Irradikation von Osteosarkomen (Az.: 55.2-1-54-2532-142-2016):**

Tier-ID: **Geschlecht:** ♂ **Herkunft:** Charles River Laboratorien, Sulzfeld **Versuchsgruppe:** **Datum Beginn Experiment:**

[illegible]

X. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg für die Möglichkeit an ihrem Institut promovieren zu dürfen, sowie für ihre große Hilfsbereitschaft, Unterstützung und Korrekturen bedanken.

Mein nächster Dank gilt Herrn Prof. Dr. van Griensven für die Möglichkeit der Dissertation am Klinikum rechts der Isar und die finanzielle Unterstützung. Ebenso gilt mein Dank in diesem Zusammenhang Frau PD Dr. Elizabeth Rosado-Balmayor. Der AG Pires danke ich für die Bereitstellung des aKA.

Ein riesiges Dankeschön geht an Anna und Sandra, die mich besonders während des Tierversuchs unglaublich unterstützt haben und mir sogar an den Wochenenden zur Seite standen. Auch beim restlichen Team (Fritz, Marc, Paul, Sonja, Sonia, Lukas und Marina) möchte ich mich herzlich bedanken für die stete Hilfsbereitschaft, ihren Beistand, lustige Labormomente, Karaokeabende und Badmintonspiele.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Nicole für die Hilfe beim TVA, Durchführung des Tierversuchs und sonstigen Belangen bedanken. Ohne dich hätte ich das alles nicht geschafft. Sehr schade, dass wir keine Kolleginnen mehr sind.

Vielen Dank an Sepp für die Hilfe bei der Histologie und die lustigen Gespräche über Gott und die Welt. In diesem Zusammenhang auch Danke an die AG Bissinger für die Nutzung des Slidescanners und Kirsten für die sehr lustigen Helene-Sessions. Tausend Dank an Herrn Dr. Majzoub-Altweck und Frau Dr. Yen für die freundliche Hilfe bei der pathologischen Befundung.

Bei Michael Stein möchte ich mich für die ausführliche Hilfe mit dem MagPix bedanken. Dasselbe gilt für Gregor, Martin und Robert von PreSens, danke für die dreijährige Zusammenarbeit.

Meinen lieben Freunden gebührt ebenfalls ein großes Dankeschön. Danke an Ulla, Tini, Katha, Krissi und Caro für die unfassbar schönen Studien- und Doktorandenjahre sowie das Durchschreiten jeglicher Höhen und Tiefen. Unsere

gemeinsamen Jahre inklusive legendärer Kabus, Abende im alten Hut, Arming, Wiesn usw. werden mir immer als eine der besten Zeiten in Erinnerung bleiben. Auch bei meinen Orchesterfreunden Sarah, Anna, Raphaela, Ralph, Christian, André, Gabi, Magdalena und Laura möchte ich mich bedanken für tolle Konzerte, Isargrillereien und geniale Abende in inzwischen fast 8 Jahren. Ohne euch alle wäre München nie die große Liebe für mich geworden, die es heute ist! Ebenfalls erwähnen möchte ich Lilli, auch dir vielen Dank für deine Freundschaft und Unterstützung.

Natürlich möchte ich mich auch herzlich bei meinem Basti bedanken, der mit mir wochenlang durch das dunkelste Tal der Tränen gegangen ist und sich immer wieder meine Probleme angehört hat. Ich bin sehr froh, dich an meiner Seite zu wissen und dass ich mich immer auf dich verlassen kann.

Meiner Familie kann ich gar nicht genug danken: Danke für die unendliche, allumfassende Unterstützung, den Beistand und das Vertrauen, das ihr mir schon mein ganzes Leben lang entgegenbringt. Ohne euch wäre ich nie so weit gekommen. Ich danke euch von Herzen für Alles!